

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INTERACTION DU PARASITOÏDE *DINOCAMPUS COCCINELLAE* AVEC LA
COCCINELLE EXOTIQUE *HARMONIA AXYRIDIS* PALLAS ET LA COCCINELLE
INDIGÈNE *COLEOMEGILLA MACULATA LENGI* TIMBERLAKE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
ANNABELLE FIRLEJ

JANVIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur Daniel Coderre pour m'avoir donné la chance de réaliser ce doctorat ainsi que pour sa confiance durant ces années; également pour ses critiques et conseils toujours de grande qualité ainsi que pour son positivisme constant qui réconforte même après un syndrome de backdraft Coderrien (Vanoosthuyse, 2003). Je reste en rogne contre l'administration qui l'a kidnappé et ne m'a donné qu'un accès limité à toutes ses qualités de directeur.

Merci à mon co-directeur Guy Boivin pour son soutien et la qualité de ses conseils scientifiques, ses encouragements, sa qualité de correcteur (pas forcément basée sur la quantité de rouge...). Je le remercie pour son extrême disponibilité et sa bonne humeur. Être son étudiante a été des plus agréables...Je vais quitter ma vie dans le labo 208 avec regret: « la vie est vraiment trop injuste! »

Merci à mon deuxième co-directeur, Éric Lucas, pour ses conseils scientifiques, ses encouragements et pour son rôle d'avocat du diable.

Je tiens à remercier, pour leur soutien technique, les techniciennes Danielle Thibodeau, Josianne Vaillancourt et Julie Frenette, ainsi que les étudiantes d'été Catherine Bernier, Mathilde Lheureux et Audrey. Pour les collections de coccinelles asiatiques, merci à la contribution volontaire de Michel Fortin, Danielle Thibodeau, Guy Boivin, Gérald Chouinard et des autres personnes du Centre de Recherche en Horticulture de St-Jean-sur-Richelieu. Pour ses multiples conseils professionnels en matière de statistique, merci à Mick.

Je remercie le laboratoire d'Écobiologie des Insectes Parasitoïdes de Rennes pour leur accueil et leur soutien lors d'un stage de microscopie électronique. Plus particulièrement, merci à Jean-Pierre Nénon, Christelle Paty-Jamonneau, Jo Le Lannic, Marlène Goubault et Sonia Dourlot. Également, merci au laboratoire d'Écologie Microbienne des Insectes et Interactions Hôte-Pathogène de Montpellier : Michel Brehélin, Pierre-Alain Girard, ainsi que tous les étudiants et personnes du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur aide.

Merci à Véro pour son amitié tout au long de ces quatre années, les discussions scientifiques, les conseils pour la rédaction, son aide dans les manips, pour les pauses chocolat et pepsi, les party...Bref, pour sa présence lors des moments de découragement comme ceux d'optimisme.

Je n'oublie pas Marlène, Sara, Favio, Mick et Maryse qui ont permis, de multiples manières, à rendre la vie de labo très sympathique. Merci à Isabelle, Benoît, Nathalie et Claudio, du labo de l'UQAM, pour leur bonne humeur, leur amitié et leur esprit critique.

Merci à la troupe des amis, Fanie, Francine et Éric, Karelle, Bruno et Marie, Mathieu et Hélène et Anh Thu pour leurs encouragements et leur amitié toujours égale au fil des années. Un ÉNORME merci à Dave et Béa et un deuxième ÉNORME merci à la famille Bidoux...

Merci aux organismes qui ont contribué au financement de la thèse: les bourses PAFARC, Hydro-Québec et du Ministère de l'Éducation du Québec.

Merci à ma famille et belle-famille pour leur soutien à distance...

Mille mercis Franz....

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	7
 CHAPITRE 1: First report of <i>Harmonia axyridis</i> Pallas being attacked by <i>Dinocampus coccinellae</i> Schrank in Canada	 28
RÉSUMÉ	29
ABSTRACT	30
INTRODUCTION.....	31
MATERIALS AND METHODS.....	32
RESULTS AND DISCUSSION	33
REFERENCES.....	36
 CHAPITRE 2: Impact of host behavioural defences on an indigenous parasitoid preference.....	 39
RÉSUMÉ	40
ABSTRACT	41
INTRODUCTION.....	42
MATERIALS AND METHODS.....	44
RESULTS	48
DISCUSSION	52
ACKNOWLEDGMENTS.....	55
REFERENCES.....	56
 CHAPITRE 3: Teratocyte growth pattern reflects host suitability in a host–parasitoid assemblage	 62

RÉSUMÉ	63
ABSTRACT	64
INTRODUCTION.....	65
MATERIALS AND METHODS.....	67
RESULTS AND DISCUSSION	69
ACKNOWLEDGMENTS.....	78
REFERENCES.....	79
 CHAPITRE 4: The immune response of the coccinellid <i>Harmonia axyridis</i> to parasitism by <i>Dinocampus coccinellae</i>	 83
RÉSUMÉ	85
ABSTRACT	86
INTRODUCTION.....	87
MATERIALS AND METHODS.....	89
RESULTS	91
DISCUSSION	111
ACKNOWLEDGMENTS.....	114
REFERENCES.....	115
 DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES	 119
BIBLIOGRAPHIE	132

LISTE DES FIGURES

Figure E.1 : Nombre moyen d'espèces d'ennemis naturels attaquant les espèces invasives dans leur région d'origine et d'introduction (tiré de Mitchell & Power 2003 et Torchin et al. 2003).	9
Figure E.2 : Cycle de vie de <i>D. coccinellae</i> dans <i>C. maculata</i> .	24
Figure 2.1: Proportion of host encounter by <i>D. coccinellae</i> in paired-choice tests (***: $p < 0.001$, Chi-square test).	49
Figure 2.2: Proportion of behavioural defences expressed against the parasitoid in paired-choice tests (*: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$, Chi-square test).	51
Figure 3.1: <i>Dinocampus coccinellae</i> larval size (μm) in suitable host <i>Coleomegilla maculata</i> and marginal host <i>Harmonia axyridis</i> as a function of time post-parasitization (days).	73
Figure 3.2: <i>Dinocampus coccinellae</i> teratocyte diameter (μm) in suitable host <i>Coleomegilla maculata</i> and marginal host <i>Harmonia axyridis</i> as a function of time post-parasitization (days).	74
Figure 3.3: <i>Dinocampus coccinellae</i> teratocyte number in suitable host <i>Coleomegilla maculata</i> and marginal host <i>Harmonia axyridis</i> as a function of time post-parasitization (days).	75
Figure 4.1: TEM of plasmatocyte (Pl) from <i>H. axyridis</i> adults: cell with short pseudopods (arrow), well developed golgi (arrowheads), rough endoplasmic reticulum (RER) in narrow cisternae (asterisk) and heterogeneous bodies like secondary lysosomes (1); N=nucleus. Bar = 1 μm .	92
Figure 4.2: Plasmatocytes (Pl) of <i>H. axyridis</i> in phase contrast microscopy. Hemocytes were collected from adult insect in anticoagulant buffer and applied on coverslip. Bar = 10 μm .	93
Figure 4.3: Phagocytosis by hemocytes 4 h after <i>H. axyridis</i> adult injection with killed FITC-labelled <i>E. coli</i> . A = hemocytes in phase contrast and B = in epifluorescence after quenching by Trypan blue. Two granular hemocytes I (GHI) and one plasmatocyte (Pl) have engulfed bacteria. Bar = 10 μm .	93
Figure 4.4: TEM of granular hemocyte I (GH I) from <i>H. axyridis</i> adults. A = GH I with RER well developed in large cisternae (asterisk) and three different types of	

granular inclusion (1 to 3). Bar = 1 μm . B = view of structured granules (1) with a microtubular internal structure and in relation with golgi complex (arrowheads); N=nucleus. Bar = 200 nm. 95

Figure 4.5: Two GH I in phase contrast microscopy adhering to a microscope slide by means of short pseudopods. Bar = 8 μm 96

Figure 4.6: Phagocytosis by GH I 2 h after injection of *H. axyridis* adult with killed FITC-labelled *E. coli*. A = hemocytes in phase contrast and B = in epifluorescence after quenching by Trypan blue. Several bacteria are present in each GH I. Bar = 10 μm 96

Figure 4.7: TEM of granular hemocyte II (GH II) from *H. axyridis* adults. Cell with characteristics similar to Pl: short pseudopods (black arrowhead) and few RER in narrow cisternae (white arrowheads), but also with some area of glycogen (arrow) and numerous electron dense granular inclusions (white asterisk); N=nucleus. Bar = 1 μm 97

Figure 4.8: Hemocytes from *H. axyridis* adults in phase contrast microscopy. Two GH II among GH I and Pl: the size of their granular inclusions allows easy recognition of these cells. Bar = 10 μm 98

Figure 4.9: GH II and Pl beginning nodule formation around killed FITC labelled *E. coli* (white asterisk) and hemocytes in necrosis (TEM). Bar = 2 μm 99

Figure 4.10: TEM of oenocytoid (Oe) from *H. axyridis* adults. This hemocyte can be recognized by its regular size, shape, eccentric nucleus (N) and the paucity of cytoplasmic organelles with exception of the ribosomes associated in polysomes (arrowheads); N=nucleus. Bar = 500 nm. 101

Figure 4.11: TEM of spherule cell (Sph) from *H. axyridis* adults. Cells with hypertrophied RER (arrowheads) and two different structured granules, (1) = granules similar to GH I granules but larger, (2): oval granule with an internal structure and localized in cell periphery; N=nucleus. Bar = 2 μm 102

Figure 4.12: Cluster of hemocytes 30 min after *H. axyridis* adult injection with killed FITC labelled *E. coli*. Large Sph (top) shows characteristic oval dense granules located at the periphery of the cell (arrows). Note the presence of an other cell (bottom) of a smaller size than Sph but that also shows the presence of the same granules. Bar = 25 μm 103

Figure 4.13: Sph recovered from *H. axyridis* adult in phase contrast microscopy: oval (arrows) and rounded (arrowheads) granules seem to be released by the cell and are numerous and free in hemolymph (see also fig. 15). Bar = 10 μ m. 104

Figure 4.14: TEM of cells from *H. axyridis* adults, intermediate between Pl and GH II. This cell possesses a morphology similar to Pl except for granular inclusions (arrowheads) that are similar to GH II granules; N=nucleus. Bar = 1 μ m. 106

Figure 4.15: TEM of cell from *H. axyridis* adults, intermediate between GH I and Sph. This cell possesses organelles similar to GH I such as granular inclusions (1) in relation with golgi complex and features similar to Sph, with RER hypertrophied (asterisk) and internally structured granules (2) also seen free in the plasma bathing the hemocytes; N=nucleus. Bar = 1 μ m. 107

Figure 4.16: Kinetics of Sephadex[®] bead encapsulation in *H. axyridis*. (For each time: N=number of replicates; n=mean number of beads recovered). 108

Figure 4.17: Kinetics of *D. coccinellae* egg encapsulation after (A) 6 h or (B) 24 h of contact with *H. axyridis*. (For each time: N=number of replicates; n=mean number of parasitoid eggs recovered). 110

Figure D.1 : Nombre d'articles scientifiques publiés sur les populations de *H. axyridis* présentes dans les régions d'origine (Japon, Chine, ex-URSS) et d'introduction (Amérique du Nord, du Sud et Europe). 122

Figure D.2 : Modèle de simulation sur les densités de *C. maculata*, *H. axyridis* et *D. coccinellae* à leur densité d'équilibre (tiré de Hoogendoorn & Heimpel 2002) (r_1 et r_2 représentent les taux d'accroissement des populations de *C. maculata* et *H. axyridis* respectivement et a_1 et a_2 les taux d'attaque de *D. coccinellae* sur *C. maculata* et *H. axyridis* respectivement). 128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau E.1 : Liste des espèces de parasitoïdes attaquant <i>H. axyridis</i> et pourcentage de parasitisme issu de dissections dans les lieux d'origine ou d'introduction de <i>H. axyridis</i>	20
Tableau E.2 : Parasitisme de terrain et laboratoire de <i>C. maculata</i> par <i>D. coccinellae</i> en Amérique du Nord.....	22
Tableau E.3: Liste des espèces hôtes de <i>Dinocampus coccinellae</i> et de leur localisation géographique (Tiré de Hodek & Honěk 1996 et Majerus 1997).....	25
Table 1.1: Monthly data on parasitism of <i>H. axyridis</i> and <i>C. maculata</i> by <i>D. coccinellae</i> as determined by dissection. Parasitism rates were compared between species within a month using a Chi-square test ($p < 0.05$).....	34
Table 2.1: Description of parasitoid and host behaviours recorded.....	47
Table 2.2: Comparison of host behavioural defences, handling time, attack preference and oviposition in paired-choice tests involving <i>H. axyridis</i> and <i>C. maculata</i> adults and 4th instar larvae as hosts and <i>D. coccinellae</i> as parasitoid.....	50
Table 3.1: <i>Dinocampus coccinellae</i> biological parameters after parasitization of 4 th instar larvae and adults of <i>C. maculata</i> and <i>H. axyridis</i>	71
Table 3.2: Linear regression analysis parameters of <i>D. coccinellae</i> larval size, teratocyte number and teratocyte diameter evolution as a function of time post-parasitization.	76
Tableau D.1 : Diversité des ennemis naturels attaquant <i>H. axyridis</i> dans les régions d'origine (Japon, Chine, ex-URSS) et d'introduction (Amérique du Nord).....	121

RÉSUMÉ

Depuis son établissement en Amérique du Nord en 1988, la coccinelle exotique *Harmonia axyridis* Pallas a envahi tous les milieux agricoles et urbains avec des populations pouvant atteindre des densités importantes. Cette espèce exotique est peu régulée par les ennemis naturels indigènes de la nouvelle région envahie. Notamment, les connaissances sur sa relation avec un parasitoïde indigène abondant, *Dinocampus coccinellae* Schrank demeurent maigres. Cette thèse avait donc pour but de mettre en lumière les barrières comportementales, physiologiques et immunitaires à la nouvelle relation *H. axyridis*-*D. coccinellae*.

La première partie consiste en une étude de terrain visant à estimer les taux de parasitisme en milieu naturel (champs de maïs et luzerne) de la coccinelle exotique *H. axyridis* et de la coccinelle indigène *C. maculata*. L'étude réalisée de juin à septembre en 2002 a démontré que l'espèce exotique est peu susceptible au parasitisme par le parasitoïde *D. coccinellae*. En moyenne 4,6% des individus *H. axyridis* disséqués étaient parasités comparativement à 32% pour *C. maculata*, sur la saison. Après élevage en laboratoire de la moitié des individus capturés pour déterminer le succès de parasitisme, 0% des coccinelles *H. axyridis* et 5,9% des coccinelles *C. maculata* étaient parasitées avec succès par *D. coccinellae*. Les causes possibles de ce faible pourcentage de parasitisme ont par la suite été étudiées.

La deuxième partie examine la question du choix d'oviposition par le parasitoïde en fonction des comportements de défense des hôtes disponibles. L'effet des comportements de défense des stades larvaires et adultes de *H. axyridis* et *C. maculata* a été évalué sur le temps de manipulation de l'hôte, la préférence d'attaque et l'oviposition du parasitoïde. Il a été démontré que les comportements de défense des *H. axyridis* adultes ont pour effet d'accroître le temps de manipulation de l'hôte par les femelles *D. coccinellae*. Cependant, même si les adultes de l'hôte exotique présentent des comportements de défense efficaces, la femelle parasitoïde n'affiche pas une préférence d'attaque inférieure pour cet hôte par rapport à *C. maculata*. Ces observations ainsi que le peu d'œufs de parasitoïdes dénombrés au terme de cinq jours de maturation chez les adultes de *H. axyridis* suggèrent que l'hôte exotique est de faible qualité pour le parasitoïde. De plus, ce dernier pourrait utiliser des informations inadéquates pour évaluer les adultes de l'hôte exotique *H. axyridis*.

La troisième partie expose une étude sur l'adéquation de l'hôte exotique et de l'hôte indigène pour le développement de *D. coccinellae*. Notamment, le patron de croissance des cellules trophiques, les tératocytes, qui jouent un rôle important dans la nutrition de l'immature de *D. coccinellae* a été étudié. Les résultats ont confirmé que l'hôte exotique est un hôte d'acceptabilité marginale pour le développement du parasitoïde : seuls les stades larvaires de *H. axyridis* sont parasités efficacement et le succès du parasitisme demeure faible et le temps de développement de l'immature est prolongé. Également, le patron de croissance des tératocytes diffère selon que l'hôte est *H. axyridis* ou *C. maculata*. L'évolution de la croissance en taille et du nombre de tératocytes dans *H. axyridis* est très variable et ne suit pas les patrons linéaires mis en évidence chez *C. maculata*. Le patron de croissance des tératocytes apparaît comme un critère utile afin d'évaluer l'adéquation des hôtes pour le parasitoïde.

La quatrième partie porte sur l'implication du système immunitaire des *H. axyridis* adultes dans l'élimination du parasitoïde; elle consiste en une étude des hémocytes et de leurs fonctions en utilisant des techniques de microscopie électronique et photonique. Cinq types d'hémocytes ont été mis en évidence chez les adultes de *H. axyridis* : les plasmotocytes, les hémocytes granulaires de type I, les hémocytes granulaires de type II, les oenocytoïdes et les cellules à sphérules. Seuls les hémocytes granulaires de type II et les plasmotocytes sont impliqués dans la nodulation de bactéries et l'encapsulation des œufs de parasitoïdes. L'injection de billes de Sephadex® chez des *H. axyridis* adultes a permis d'évaluer le taux d'encapsulation des billes lequel s'est avéré être de 28,5% après 24 h et de 81,1% après cinq jours. Une encapsulation complète était observée pour 20,9% des œufs de parasitoïde pondus après 24 h et seulement 32,7% après cinq jours. Cette faible hausse d'efficacité du système immunitaire peut être attribuable à une rapide augmentation de la taille des œufs du parasitoïde. Également, il y a une diminution de la réponse immunitaire avec l'augmentation du nombre d'œufs pondus par le parasitoïde. Cependant, le système immunitaire de *H. axyridis* est une composante physiologique pouvant jouer un rôle dans l'évitement de cette espèce exotique aux endoparasites indigènes d'Amérique du Nord.

L'étude des interactions entre *H. axyridis* et *D. coccinellae* à divers niveaux (comportemental, physiologique et immunitaire) supporte l'hypothèse selon laquelle *H. axyridis* échappe aux parasitoïdes dans la région envahie. Les résultats suggèrent que les adultes de *H. axyridis* représentent un piège évolutif ainsi qu'un puit d'œufs pour le parasitoïde et que les larves de *H. axyridis* sont des hôtes marginaux pour le développement et le succès du parasitoïde.

Mots-clefs : Invasion biologique, Interaction hôte-parasitoïde, *Harmonia axyridis* Pallas, *Dinocampus coccinellae* Schrank.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les individus survivent dans leur environnement par l'acquisition des ressources nécessaires à leur développement et l'évitement de leurs ennemis naturels. Au cours de l'évolution, la sélection naturelle n'a retenu que les individus utilisant les meilleures stratégies en terme de valeur adaptative et c'est pourquoi les organismes observés en nature affichent un certain niveau d'adaptation à leur environnement abiotique et de coévolution avec leur environnement biotique. Que se passe-t-il quand une espèce est confrontée à un changement dans son environnement, qu'elle interagit avec une nouvelle entité biotique avec laquelle elle n'a pas d'histoire évolutive commune? Cette situation peut se produire dans un contexte d'invasion biologique. En effet, alors que les échanges commerciaux, les migrations de populations et la modification des habitats par l'homme s'intensifient, les invasions biologiques par le transport d'espèces en dehors de leur limite d'habitat naturel sont des phénomènes en expansion. Les espèces exotiques ayant surmonté les diverses barrières à la colonisation établissent de nouvelles relations avec des ressources, des compétiteurs et des ennemis naturels.

Les ennemis naturels présents dans un nouvel habitat s'attaquent peu aux espèces invasives ce qui expliquerait en partie le succès de celles-ci dans leur nouvel environnement (Keane & Crawley 2002; Shea & Chesson 2002; Prenter et al. 2004; Torchin & Mitchell 2004). Selon le concept de « piégeage évolutif » (Schlaepfer et al. 2005), les réponses des espèces indigènes aux nouvelles informations issues des espèces invasives seraient mal adaptées. Les barrières écologiques, comportementales ou physiologiques à l'origine de la faible susceptibilité des espèces invasives aux ennemis naturels indigènes restent souvent peu étudiées puisque l'attention est plutôt donnée à la relation entre les espèces exotiques et leur nouvelle ressource ou compétiteurs. Une fois l'espèce invasive installée, comment les nouvelles relations espèces exotiques-espèces indigènes vont-elles évoluer? Les invasions biologiques sont des opportunités d'observation de processus évolutifs en action, notamment dans les associations prédateur-proie et hôte-parasitoïde.

Les parasitoïdes sont des insectes accomplissant leur développement larvaire à l'intérieur ou sur un autre insecte hôte, lequel meurt invariablement des suites du parasitisme (Price 1984). En raison de la relation étroite que nécessite ce type de développement et des pressions de sélection réciproques qu'une exerce sur l'autre, le système hôte-parasitoïde est un modèle adéquat pour l'étude de la mise en place de nouvelles associations et de la coévolution. Les femelles parasitoïdes réagissent à un ensemble de stimuli afin de trouver, évaluer et accepter un hôte pour le développement de leur progéniture dont la survie est directement liée à la qualité de cet hôte (Godfray 1994). Comme il existe un lien direct entre le comportement décisionnel de la femelle dans le choix des hôtes à parasiter et le gain de valeur adaptative qui en découle, le comportement des femelles parasitoïdes est soumis à une forte pression sélective qui en fait un modèle attrayant d'étude en écologie comportementale et en écophysiologie.

La décision des femelles parasitoïdes de pondre dans un hôte est dynamique (Iwasa et al. 1984; Mangel 1989; Godfray 1994). Elle sera influencée par les stimuli externes émis par l'hôte, reflétant sa qualité interne (taille, espèce, stade, ...), les défenses comportementales de l'hôte, les stimuli de l'environnement (présence de compétiteurs) et l'état physiologique de la femelle parasitoïde (charge en œufs, espérance de vie). La sélection naturelle favorise une étroite relation entre les stimuli externes de l'hôte faisant l'objet d'un choix d'oviposition et la qualité interne de l'hôte évalué. En effet, la survie des immatures parasitoïdes est liée à l'adéquation de l'hôte (Vinson 1976; Vinson & Iwantsch 1980). Cette adéquation est définie par la qualité nutritionnelle de l'hôte ainsi que par les défenses physiologiques (toxines, système immunitaire) mises en place pour se débarrasser du parasitoïde immature. Lorsqu'un parasitoïde rencontre un hôte exotique dans son habitat, sa capacité à relier les stimuli externes à la qualité interne du nouvel hôte n'a pas été sélectionnée étant donné l'absence d'histoire évolutive commune. Ainsi les aspects d'écologie comportementale et d'écophysiologie pourraient permettre d'expliquer l'interaction entre les parasitoïdes indigènes et les hôtes exotiques ainsi que leur évolution.

OBJECTIF DE LA THÈSE

Ce travail a débuté suite à l'établissement au Québec en 1994 de la coccinelle exotique invasive *Harmonia axyridis* Pallas (Coderre et al. 1995) et à l'absence de régulation de ses populations par le parasitoïde généraliste *Dinocampus coccinellae* Schrank dont le spectre d'hôtes comprend des coccinelles indigènes de la zone envahie. L'objectif général de la thèse était donc d'évaluer l'existence de barrières comportementales, physiologiques et immunitaires impliquées dans la nouvelle interaction hôte-parasitoïde : *H. axyridis*–*D. coccinellae*.

État des connaissances

La première partie présente une revue de littérature sur la théorie associée aux espèces invasives, la coévolution, l'écologie comportementale et l'écophysiologie des systèmes hôtes-parasitoïdes, ainsi que la présentation du système étudié composé de l'hôte exotique *H. axyridis*, l'hôte indigène *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake et du parasitoïde indigène *D. coccinellae*.

Chapitre 1

La justification écologique aux études subséquentes de laboratoire est présentée dans le chapitre 1 par une étude de terrain réalisée afin d'évaluer la susceptibilité de *H. axyridis* au parasitoïde *D. coccinellae* dans un habitat agricole du Québec.

Cette étude est présentée dans l'article suivant :

Firlej A., Boivin G., Lucas E. & Coderre D. 2005. First report of *Harmonia axyridis* Pallas being attacked by *Dinocampus coccinellae* Schrank in Canada. *Biological Invasions* 7: 553-556.

Chapitre 2

Les défenses comportementales des hôtes face à une femelle parasitoïde sont des traits comportementaux exerçant une pression de sélection sur la femelle, influençant sa valeur adaptative (augmentation du temps de manipulation et diminution du taux

d'oviposition) et influençant sa préférence pour des hôtes (Gross 1993). L'influence des comportements défensifs sur les préférences des femelles parasitoïdes a surtout été étudiée au sein de différents stades hôtes d'une même espèce (Cornell et al. 1987; Allen 1990; Gerling et al. 1990; Chau & Mackauer 1997; Walker & Hoy 2003).

L'espèce exotique *H. axyridis* est décrite comme une coccinelle agressive dont les comportements défensifs jouent un rôle important dans les interactions hétérospécifiques en situation de prédation intragilde (Yasuda & Onhuma 1999; Yasuda et al. 2001; Michaud 2002; Snyder et al. 2004; Yasuda et al. 2004; Sato et al. 2005). Cependant, même si certaines études quantifient les comportements défensifs de *H. axyridis* par les taux d'attaques et les taux d'évasion (Yasuda et al. 2001; Yasuda et al. 2004), d'autres se basent sur les pourcentages de mortalité des espèces de coccinelles qui interagissent avec *H. axyridis* sans observer directement la présence des comportements défensifs (Yasuda & Onhuma 1999, Michaud 2002; Snyder et al. 2004; Sato et al. 2005). Le comportement défensif de *H. axyridis* pourrait représenter une barrière au parasitisme par *D. coccinellae*. En effet, aucune étude ne s'est intéressée aux mécanismes défensifs de *H. axyridis* envers les parasitoïdes et plus particulièrement *D. coccinellae*. Le chapitre 2 présente donc une étude sur l'influence des comportements de défenses d'un hôte indigène *versus* un hôte exotique sur le choix de ponte du parasitoïde. Dans ce cas, l'hôte exotique présente des niveaux de défense comportementale plus élevés que ceux de l'hôte indigène.

L'hypothèse est que la différence dans les défenses comportementales des deux hôtes (exotique *versus* indigène) va influencer le choix du parasitoïde *D. coccinellae*. Les prédictions testées sont que 1) le temps de manipulation sera plus grand et le taux d'oviposition sera plus faible face à l'espèce plus défensive *H. axyridis* et que 2) le parasitoïde démontrera une préférence de ponte pour l'hôte le moins défensif, *C. maculata*.

Cette étude est présentée dans l'article suivant :

Firlej A., Lucas E., Coderre D. & Boivin G. En préparation. Impact of host behavioural defences on an indigenous parasitoid preference. Biological Control.

Chapitre 3

La qualité d'un hôte peut influencer diverses variables relatives à la descendance d'une femelle parasitoïde, comme le temps de développement de l'immatrice, la survie, la taille et la fécondité du parasitoïde adulte résultant (Waage & Godfray 1985; Godfray 1994). La qualité de l'hôte varie selon l'espèce, la taille de l'individu, son âge, sa condition physiologique et la réponse immunitaire (Hsiao et al. 1966; Vinson & Iwantsch 1980; Ruberson & Kring 1993). Certains œufs de parasitoïdes produisent des cellules appelées tératocytes qui ont des propriétés immunodépressives, nutritionnelles et sécrétrices pouvant perturber la physiologie de l'hôte et le rendre plus acceptable pour le développement de l'immatrice du parasitoïde (Dahlman 1990). Les tératocytes augmentent en taille au fur et à mesure que le parasitoïde immature se développe et dans certains cas, leur nombre diminue progressivement suite à leur ingestion par le parasitoïde immature (Dahlman 1990). Le chapitre 3 compare donc l'influence de la qualité de l'hôte exotique à celle de l'hôte indigène sur le parasitoïde et l'implication plus particulière des tératocytes dans l'adéquation des hôtes.

L'hypothèse est que le patron de croissance des tératocytes pourrait refléter l'adéquation d'un hôte pour un parasitoïde. La prédiction étant que le nombre de tératocytes de *D. coccinellae* dans l'hôte exotique *H. axyridis* sera moins grand que dans l'hôte indigène *C. maculata*.

Cette étude est présentée dans l'article suivant :

Firlej A., Lucas E., Coderre D. & Boivin G. Sous presse. Teratocyte growth pattern reflects host suitability in a host-parasitoid assemblage. *Physiological Entomology*.

Chapitre 4

Les œufs d'un parasitoïde pondus dans l'hémolymph d'un hôte sont susceptibles au système immunitaire de l'hôte. Ce système comporte deux volets: la voie humorale et la voie cellulaire qui implique des cellules immunitaires appelées hémocytes (Lavine & Strand 2002). L'encapsulation intervient en quelques heures ou jours et provoque l'asphyxie du corps étranger vivant. Le système immunitaire des coccinelles et son fonctionnement dans le

cas d'infection pathogène ou lors du parasitisme n'ont cependant jamais été étudiés. La présence d'hémocytes a été observée dans l'hémolymph et dans le réflexe de saignement de coccinelles, cependant aucune description n'en a été faite (Dixon 2000; Karystinou et al. 2004). Suite à des observations de comportements d'oviposition de *D. coccinellae* dans des adultes *H. axyridis*, et à l'absence de développement d'œufs ou d'immatures, il est possible que le système immunitaire de *H. axyridis* soit impliqué dans la faible réussite parasitaire du parasitoïde *D. coccinellae*. Ce chapitre présente donc une étude descriptive des hémocytes du système immunitaire de *H. axyridis*, leurs fonctions et leur rôle dans la relation *H. axyridis*–*D. coccinellae*.

Cette étude est présentée dans l'article suivant :

Firlej A., Girard P.-A., Brehélin M., Coderre D. & Boivin G. En préparation. The immune response of the coccinellid *Harmonia axyridis* to parasitism by *Dinocampus coccinellae*. *Journal of Invertebrate Pathology*.

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Les invasions biologiques

Une espèce indigène¹ est une espèce qui se rencontre à l'intérieur de son aire de vie naturelle et son aire de dispersion potentielle par opposition à une espèce non indigène² qui est une espèce introduite ou qui s'étend au-delà de son aire de vie naturelle passée ou présente (Richardson et al. 2000; Falk-Petersen et al. 2006). Lorsqu'une espèce non indigène introduite se disperse à plus de 100 m d'un point d'introduction, s'établit³ dans une nouvelle aire et devient abondante, elle est considérée alors comme une espèce invasive (Richardson et al. 2000; Falk-Petersen et al. 2006). Telle que décrite par Williamson (1996), une invasion biologique représente l'expansion géographique d'une espèce dans un environnement qu'elle n'occupait pas auparavant. Même si la majorité des invasions biologiques sont reliées aux activités humaines, des invasions naturelles sont observables (Williamson 1996).

Le nombre d'espèces non indigènes introduites chaque année est relativement important, et en 2000, on estimait à 50 000 le nombre d'espèces non indigènes présentes aux États-Unis (Pimentel et al. 2000), qu'elles soient bénéfiques (ex. : espèces cultivées pour consommation humaine) ou nuisibles (ex. : ravageurs des cultures). Le coût des dommages associés aux espèces non indigènes représenterait 120 milliards de dollars par année (Pimentel et al. 2005). Les introductions d'espèces non indigènes arrivent soit de manière accidentelle, lors d'échanges commerciaux maritimes, aériens ou terrestres, soit lors des migrations naturelles d'individus ou soit de manière volontaire pour des raisons économiques (i.e. espèces domestiquées et cultivées ou lutte biologique) (Mack et al. 2000). Les espèces non indigènes de plantes et de vertébrés sont introduites le plus souvent de manière intentionnelle et les invertébrés et pathogènes de manière accidentelle (Mack et al. 2000; Pimentel et al. 2000). Aux frontières des États-Unis, où 20 à 25% des cargos commerciaux sont contrôlés par les services gouvernementaux, une espèce non indigène est détectée tous

¹ Synonyme d'espèce native (Falk-Petersen et al. 2006)

² Synonyme d'espèce exotique (Falk-Petersen et al. 2006)

³ Une espèce est considérée établie quand elle a survécu au moins cinq ans dans un nouvel habitat et que sa population s'auto-entretient (Kimberling 2004)

les 50 cargos réfrigérés arrivant par voie maritime (Work et al. 2005). L'impact des espèces invasives sur les espèces, communautés et écosystèmes indigènes est maintenant reconnu même, si des polémiques existent encore sur les réels effets négatifs associés à ces espèces (Gurevitch & Padilla 2004). Les invasions biologiques contribuent aux changements environnementaux globaux, conséquences des activités industrielles et agricoles humaines (Vitousek 1994; Vitousek et al. 1997) et elles ont un impact sur la santé humaine, l'économie, les écosystèmes et la biodiversité des espèces (Vitousek et al. 1997).

L'invasion d'espèces non indigènes comprend trois étapes : l'introduction, l'établissement et la dispersion. Pour chaque étape, plusieurs caractéristiques de l'espèce introduite et du nouvel environnement vont favoriser le processus d'invasion : le nombre d'individus introduits, la fréquence des introductions, le type de stratégie reproductive des espèces, leur taille, leur temps de maturation, leur temps de développement, leur plasticité phénotypique, leur diversité génétique, leur habileté compétitive et de dispersion (Mack et al. 2000; Kolar & Lodge 2001; Sakai et al. 2001; Shea & Chesson 2002; Allendorf & Lundquist 2003; Ehrlich 2003; Gurevitch & Padilla 2004). Les caractéristiques de l'environnement abiotique, la ressource et les compétiteurs présents dans le nouvel environnement ainsi que la faible susceptibilité aux ennemis naturels sont les caractéristiques environnementales favorisant l'invasion et l'établissement des espèces exotiques (Keane & Crawley 2002; Shea & Chesson 2002; Torchin et al. 2002; Drake 2003; Ehrlich 2003; Torchin et al. 2003; Prenter et al. 2004; Torchin & Mitchell 2004).

Les nouvelles associations espèces exotiques-parasites indigènes

Enemy release hypothesis

Afin d'expliquer en partie le succès des espèces invasives dans un nouvel environnement, Keane & Crawley (2002) ont énoncé l'« Enemy Release Hypothesis » (ERH) qui prédit que les espèces exotiques sont moins susceptibles aux ennemis naturels dans leur nouvel habitat, ce qui augmenterait leur abondance et leur capacité à persister. Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de ce phénomène. Tout d'abord, les espèces invasives laisseraient derrière elles les parasites indigènes de leur pays d'origine (« effet filtre »). Les espèces exotiques sont souvent introduites en faible nombre dans un nouvel environnement et

les stades introduits peuvent être exempts d'ennemis naturels (ex : graine chez les plantes). Une fois dans le nouvel environnement, les populations peuvent aussi subir un goulot d'étranglement (i.e. « bottleneck ») qui réduit fortement la densité de leur population et élimine ainsi les ennemis naturels importés (Torchin et al. 2002; Prenter et al. 2004; Torchin & Mitchell 2004), notamment les ennemis naturels spécialistes. Ensuite, les espèces invasives sont peu attaquées par les ennemis naturels indigènes du nouvel environnement étant donné l'absence de coévolution (Keane & Crawley 2002; Prenter et al. 2004; Torchin & Mitchell 2004) (fig. E.1). Seuls les ennemis naturels généralistes indigènes pourraient se transférer sur ces nouvelles espèces hôtes (Keane & Crawley 2002). L'accumulation d'ennemis naturels indigènes attaquant les espèces invasives dans le nouvel environnement peut s'observer au fil du temps, mais la diversité atteinte n'est jamais aussi importante que dans la région d'origine (fig. E.1) (Cornell & Hawkins 1994; Torchin et al. 2003; Torchin & Mitchell 2004).

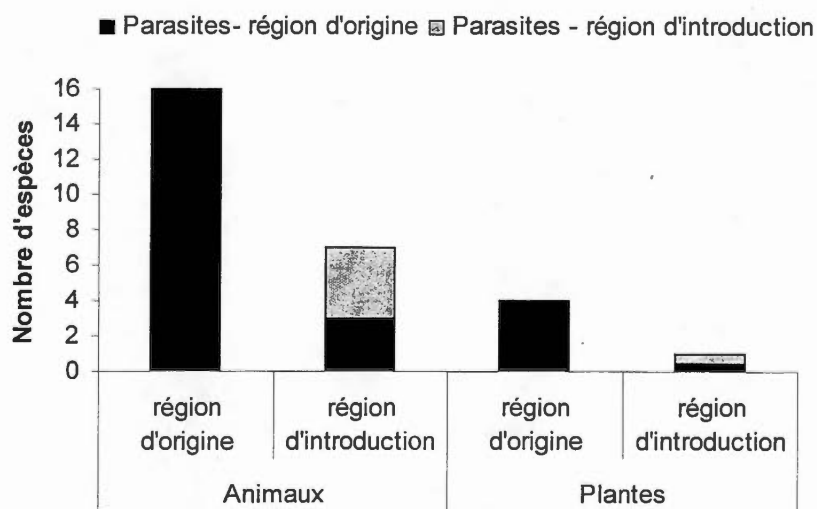


Figure E.1 : Nombre moyen d'espèces d'ennemis naturels attaquant les espèces invasives dans leur région d'origine et d'introduction (tiré de Mitchell & Power 2003 et Torchin et al. 2003).

À l'origine, l'ERH a été formulée et vérifiée dans le cadre d'invasions biologiques de plantes exotiques. Elle a été récemment vérifiée pour des espèces exotiques de mollusques, crustacés, poissons, oiseaux, mammifères, amphibiens et reptiles (Torchin et al. 2002;

Torchin et al. 2003). Chez les insectes, la chrysomèle *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte en est un exemple. Ce ravageur du maïs en Amérique du Nord a envahi l'Europe Centrale depuis 1992, mais dix ans plus tard reste inattaquée par des ennemis naturels indigènes de son nouvel environnement (Toepfer & Kuhlmann 2004). Également, le moustique *Aedes albopictus* (Skuse), originaire d'Asie et invasif aux Etats-Unis, est quant à lui attaqué par un protozoaire natif d'Amérique du Nord, *Ascogregarina taiwanensis* (Lien and Levine). Cependant, la susceptibilité de *A. albopictus* au protozoaire est limitée aux nouveaux sites colonisés, lui donnant un avantage compétitif par rapport au moustique indigène *Ochlerotatus triseriatus* (Say) (Aliabadi & Juliano 2002).

Invasion biologique et lutte biologique

Les invasions biologiques et la lutte biologique classique sont des concepts étroitement liés (Ehler 1998). L'étude des invasions biologiques pose des questions similaires à celles posées dans le domaine de la lutte biologique : quelles sont les caractéristiques des espèces invasives? Quel est l'effet de la taille des populations introduites sur les chances d'établissement? Comment est maintenue la variation génétique des espèces introduites? Quelle est l'évolution post-colonisation des espèces? La lutte biologique classique, qui consiste en l'introduction d'ennemis naturels exotiques pour lutter contre des ravageurs exotiques (Eilenberg et al. 2001), est un moyen de restaurer des associations « ravageurs exotiques-ennemis naturels exotiques » ayant coévolué afin de réguler les populations de ravageurs exotiques. La lutte biologique classique n'a pas un succès d'établissement aussi grand qu'espéré avec seulement 25 à 34% des espèces introduites qui s'établissent réellement et 16% qui assurent un contrôle adéquat du ravageur ciblé (Hall et al. 1980). De plus, la lutte biologique classique peut mener à des effets non désirés sur l'environnement et les espèces indigènes non ciblées, et aboutir à une invasion biologique (notamment par l'introduction d'espèces généralistes) (Howarth 1991; Simberloff & Stiling 1996; Ehler 1998; Pearson & Callaway 2003; Stiling 2003; Kimberling 2004). La lutte biologique est donc considérée comme une source possible d'invasion biologique (Stiling 2003; Kimberling 2004).

Une alternative à la lutte biologique classique, la lutte biologique néoclassique, se base sur le potentiel des nouvelles associations entre des ennemis naturels exotiques et des

ravageurs indigènes (Pimentel 1963; Carl 1982) ou des ennemis naturels indigènes et des ravageurs exotiques (Hokkanen & Pimentel 1989), l'hypothèse étant que des nouvelles associations sans histoire coévolutive sont plus efficaces pour contrôler les ravageurs (Hokkanen & Pimentel 1989). Cette méthode a fait l'objet de débats et reste critiquée à cause des multiples effets potentiels sur les espèces indigènes et du peu de données sur l'évolution de ces nouvelles associations (Carruthers & Onsager 1993; Lockwood 1993; Lockwood 1996). Les hypothèses d'étude de la lutte biologique et des invasions biologiques sont donc étroitement liées. De plus, les aspects de coévolution et de spectre d'hôte sont particulièrement déterminants dans le cadre de la lutte biologique comme dans le succès d'invasion d'une espèce exotique et ce ne sont pas tous les ennemis naturels introduits qui s'adaptent localement à leur proie (Hufbauer 2002).

Évolution

Facteurs d'évolution

L'évolution est un changement, à travers le temps, de la composition génotypique des individus dans une population (Futuyma 1998). Il y a quatre conditions nécessaires à l'évolution d'un trait dans une population : la reproduction, l'héritabilité du trait, la variation génétique de ce trait et un mode de sélection (aléatoire : la dérive génétique; ou sélectif : la sélection naturelle) (David & Samadi 2000). Les individus portant un trait à valeur adaptative (fitness) élevée seront plus représentés à la génération suivante. La valeur adaptative peut-être définie comme la mesure de la performance relative d'un génotype d'une espèce et sa contribution à la génération suivante (Barrows 2001). Traditionnellement, les mesures de valeur adaptative se font par la mesure de la taille du corps, du temps de développement, de la fécondité et de la fertilité. Ces mesures demeurent toutefois indirectes. La variation génétique pour un trait est déterminante pour l'évolution et plusieurs processus peuvent en être à l'origine: les mutations, la dérive génétique, la sélection naturelle et les migrations de gènes (Suzuki et al. 1991; Hufbauer & Roderick 2005).

Pièges évolutifs

Récemment, Schlaepfer et al. (2005) ont formulé l'hypothèse selon laquelle les invasions biologiques pourraient représenter des « pièges évolutifs » pour les espèces

indigènes. L'invasion d'une espèce exotique provoque une altération du nouvel environnement envahi, les informations perçues par les espèces indigènes ne sont plus forcément reliées à une avenue adaptative : les espèces indigènes exprimeraient des réponses devenues non-adaptatives et subiraient une diminution de leur survie et reproduction. La sélection naturelle devrait donc favoriser les espèces indigènes capables de créer de nouvelles relations avec les espèces exotiques, si l'impact de la réponse non-adaptative n'est pas trop sévère et s'il y a assez de variation génétique dans les populations. Ainsi les relations entre espèces indigènes et exotiques pourraient évoluer comme évoqué précédemment (Cornell & Hawkins 1994; Torchin et al. 2003; Torchin & Mitchell 2004). Deux avenues seraient donc possibles : l'adaptation ou l'extinction dépendamment de l'intensité du piégeage évolutif.

Les relations hôtes-parasitoïdes

Sélection de l'hôte

Un insecte parasitoïde se développe au détriment d'un hôte dans lequel il doit puiser les ressources pour accomplir adéquatement son développement larvaire sans se faire tuer par le système immunitaire de l'hôte (Price 1984; Godfray 1994). La qualité d'un hôte peut influencer divers paramètres de la progéniture du parasitoïde comme le temps de développement du parasitoïde immature et la survie, la taille et la fécondité du parasitoïde adulte (Hsiao et al. 1966; Vinson & Iwantsch 1980; Waage & Godfray 1985; Ruberson & Kring 1993; Godfray 1994; Karamaouna & Copland 2000). On entend par qualité de l'hôte : sa taille, son âge, son état sain ou parasité et l'espèce à laquelle il appartient. L'hôte représente la principale pression de sélection agissant sur les traits des parasitoïdes femelles et va donc modeler le comportement de sélection de l'hôte de la femelle (van Alphen & Vet 1986; Godfray 1994).

Le comportement de sélection de l'hôte par un parasitoïde est décrit comme un ensemble d'étapes par lesquelles la femelle parasitoïde passe pour parasiter avec succès un hôte (Doutt 1959; Vinson 1976; Vinson & Iwantsch 1980; van Alphen & Vet 1986; Boulétreau 1988). La conception plutôt statique des étapes de pré-oviposition menant à la localisation de l'habitat et de l'hôte a été modifiée ultérieurement en une vision plus

dynamique où la femelle parasitoïde répond à des stimuli de son environnement qui vont être les plus étroitement associés à l'hôte (Godfray 1994). Le comportement de la femelle parasitoïde va être influencé par plusieurs facteurs externes et internes : l'expérience, l'état physiologique de la femelle, la distribution spatiale des hôtes, la présence de compétiteurs et l'adaptation locale (Lewis et al. 1990; Vet et al. 1990; Rosenheim & Rosen 1991; Godfray 1994). De manière identique, une fois l'hôte trouvé, la femelle doit prendre la décision de parasiter ou non cet hôte et cette décision sera aussi influencée par l'expérience, l'état physiologique de la femelle, la qualité de l'hôte et la présence de compétitrices (Iwasa et al. 1984; Mangel 1989; Kouamé & Mackauer 1991; Visser 1995; Rivero 2000; Chau & Mackauer 2001).

Dans un système hôte-parasitoïde, un hôte a deux possibilités pour se soustraire au parasitoïde (résistance) : une en évitant le parasitoïde (mécanismes de pré-oviposition), une autre en le tuant quand il est dans son corps (mécanismes de post-oviposition). Les mécanismes de pré-oviposition sont de types morphologiques, comportementaux ou physiologiques et ceux de post-oviposition sont de types physiologiques ou immunitaires. Le parasitoïde doit réussir deux comportements pour obtenir une progéniture (virulence) : trouver l'hôte et parasiter efficacement l'hôte trouvé. L'escalade des niveaux de virulence du parasitoïde et des niveaux de résistance de l'hôte peut mener à une course aux armements (« Arms race »), et donc à une coévolution (van Valen 1973; Thompson 1982).

Les barrières pré-oviposition

Les hôtes ont développé divers mécanismes de défense qui réduisent la probabilité de servir d'hôte pour un parasitoïde (Vinson 1990; Gross 1993). Ces mécanismes peuvent être classés en trois types (Gross 1993; Godfray 1994): l'évitement, la défense passive et la défense active. Des caractéristiques morphologiques, comportementales ou de l'environnement de l'hôte peuvent être sélectionnées afin de favoriser l'évitement d'un adulte parasitoïde. La niche écologique de l'hôte peut comporter des refuges évitant à une portion de la population hôte de se faire parasiter (Hochberg & Holt 1995). L'hôte peut réduire ses mouvements afin d'éviter de se faire détecter (Carton & Sokolowski 1992) ou minimiser la production des composés chimiques liés à son alimentation ou encore disperser ses déchets

(Mauricio & Bowers 1990) afin d'éviter qu'ils soient utilisés par le parasitoïde comme indications de sa présence (Heinrich 1979; Vet et al. 1991; Vet & Dicke 1992).

La cuticule épaisse (Barzman & Daane 2001) est un mécanisme de défense passif qui a amené certains parasitoïdes à adopter une posture de ponte avec l'abdomen replié et pointant vers l'avant afin de piquer à travers les membranes inter-segmentaires plus molles (Richerson & DeLoach 1972; Shaw 1988). Également la présence de cire ou de poils recouvrant le corps des hôtes diminue l'efficacité parasitaire des parasitoïdes (Nutting & Spangler 1969; Weseloh 1976). Les mécanismes de défense active sont, par exemple, l'attaque par des coups de tête, comme chez les chenilles (Myers & Smith 1978; Stamp 1982), la chute, les mouvements de pattes, de l'abdomen et des ailes chez les pucerons (Chau & Mackauer 1997; Losey & Denno 1998). Également, le rejet de liquide toxique (Castner 1984), la hausse ou baisse de la température du corps (Müller & Schmid-Hempel 1992), la présence de fourmis gardiennes (Barzman & Daane 2001) ou la fuite (Wang & Keller 2002).

Ces défenses affectent le taux de gain de valeur adaptative (nombre de descendants par unité de temps) de la femelle parasitoïde. En effet, un hôte qui se défend efficacement va augmenter le temps nécessaire à la femelle parasitoïde afin de déposer un œuf. Ainsi le taux d'oviposition dans un hôte qui se défend efficacement est diminué (Walker & Hoy 2003). Les défenses comportementales ont pour effet de modifier la préférence d'une femelle parasitoïde pour un hôte (Gross 1993). Par exemple, les femelles de *A. ervi* préfèrent pondre dans des pucerons de stade 1 ou 2, moins adéquats pour le développement que dans des stades 5 ou adulte plus adéquats mais plus défensifs contre les tentatives de ponte de la femelle (Allen 1990; Gerling et al. 1990).

Les barrières post-oviposition

Lorsqu'un parasitoïde pond un œuf dans un hôte, l'œuf peut ne pas se développer jusqu'au stade adulte. Il y aurait deux raisons majeures à l'échec du développement : un hôte de mauvaise qualité pour le parasitoïde (aspect physiologique) ou un hôte ayant un système de défense performant (aspect immunitaire). La résistance des insectes aux parasitoïdes fait intervenir différents types de défenses immunitaires (Gupta 1986a) et leur spécificité dépend à la fois du spectre de parasitoïdes attaquant ces hôtes ainsi que de la spécificité du

parasitoïde. Les défenses immunitaires des insectes font intervenir les différents mécanismes suivants : la phagocytose, l'encapsulation, la formation de nodules, la sécrétion de facteurs immunologiques, la coagulation ou les mécanismes de détoxification des poisons (Gupta 1986a; Söderhäll & Smith 1986). Les principaux agents impliqués dans les réactions immunitaires sont : des hémocytes (notamment granulocytes et plasmotocytes), des facteurs humoraux (agglutines, lysozymes, facteurs antibactériens et anti-viraux) et le système phénoloxydatif. Les réactions immunologiques peuvent s'accompagner d'une mélanisation du corps étranger, obligatoire lors de l'encapsulation humorale ou occasionnelle lors de l'encapsulation cellulaire (Gupta 1991).

Chez les insectes, les mécanismes immunitaires les plus courants destinés aux corps étrangers de grandes tailles sont l'encapsulation cellulaire et l'encapsulation humorale (Gupta 1986b). L'encapsulation cellulaire fait intervenir deux types d'hémocytes : les granulocytes qui reconnaissent le corps étranger et qui émettent une substance de reconnaissance et les plasmotocytes qui s'agglutinent alors autour de ce corps étranger pour l'asphyxier. L'encapsulation humorale est un mécanisme ne faisant pas appel intégralement aux hémocytes mais au système enzymatique de la phénoloxydase. C'est une cascade enzymatique aboutissant à l'activation de la phénoloxydase, enzyme ayant la capacité d'oxyder les composés phénoliques en quinone, laquelle est ensuite transformée en mélanine (Söderhäll & Smith 1986; Gupta 1991). Le corps étranger est alors entouré d'une structure fibrillaire dans les quelques minutes après son contact avec l'hémolymph de l'insecte qui se mélanise peu à peu pour former une couche dense qui asphyxie le corps étranger.

Le principal défi du parasitoïde immature est alors de déjouer la réponse immunitaire de son hôte pour compléter son développement (Vinson 1990). Les parasitoïdes ont développé plusieurs stratégies de virulence afin d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte, notamment pendant et après l'oviposition par la femelle (Salt 1968; Dahlman 1990; Vinson 1990). Lors de la ponte, les femelles peuvent injecter des particules virales ou du venin, lesquels peuvent contrecarrer la réponse immunitaire de l'hôte (Doucet & Cusson 1996; Dupas et al. 1996). Lors du développement embryonnaire et larvaire, les tératocytes, l'enfouissement de l'œuf dans les tissus de l'hôte ou le recouvrement de l'œuf d'une

substance fibreuse empêchant l'adhésion des hémocytes sont des exemples de stratégies post-oviposition efficaces contre le système immunitaire de l'hôte (Davies & Vinson 1986; Eslin et al. 1996; Kraaijeveld et al. 2001).

Les tératocytes sont des cellules libérées dans l'hôte lors de l'éclosion de l'œuf du parasitoïde (Vinson & Iwantsch 1980). Ces cellules sont issues de la membrane sérosale située entre le chorion protecteur de l'œuf et l'embryon ; elles se dissocient lors de l'éclosion de l'œuf et restent en agrégats ou se dispersent dans l'hémolymph de l'hôte (Salt 1968). La présence de tératocytes a été observée chez plusieurs familles de parasitoïdes : les Scelionidae, les Platygasteridae et les Braconidae (Dahlman & Vinson 1993). Les tératocytes sont impliqués dans la réussite parasitaire par différentes voies. Ils augmentent rapidement en taille sans subir de division cellulaire (Salt 1968) et leur nombre décroît au cours du développement du parasitoïde, le plus souvent suite à leur ingestion par la larve de parasitoïde (Sluss 1968; Volkoff & Colazza 1992; Kadono-Okuda et al. 1995; Okuda & Kadono-Okuda 1995; Kadono-Okuda et al. 1998; Alleyne et al. 2001; Barratt & Sutherland 2001). La présence de microvillosités sur la membrane externe des tératocytes ainsi que leur composition élevée en lipides et glycogènes suggèrent qu'ils pourraient absorber et stocker les nutriments (Volkoff & Colazza 1992; De Buron & Beckage 1997; Hotta et al. 2001). Les tératocytes auraient aussi la capacité de produire des protéines inhibitrices de la synthèse de protéines par l'hôte (Rana et al. 2002). Ils pourraient aussi sécréter des enzymes digestives (Strand et al. 1986; Nakamatsu et al. 2002). Ces cellules sont capables d'interférer avec le système endocrinien de l'hôte, altérant ainsi son développement (Pennacchio et al. 1994). Des fonctions hormonales, anti-microbiennes et immunosuppressives leur sont aussi attribuées (Vinson 1972; Dahlman 1990). Dans une majorité de cas, les différents mécanismes impliqués dans ces fonctions sont encore peu connus (Dahlman 1990; Dahlman & Vinson 1993).

Modèles de coévolution hôte-parasitoïde

La présence d'une coévolution entre deux espèces requiert une variation génétique pour des traits influençant l'attaque (virulence) et la défense (résistance) ainsi que la sélection naturelle agissant sur ces traits (i.e. pression de sélection) (Carton & Nappi 1991; Henter

1995; Henter & Via 1995). Les études d'évolution de résistance et de virulence chez les complexes hôtes-parasitoïdes ont presque été exclusivement réalisées sur le complexe des mouches *Drosophila* sp. et de leurs parasitoïdes et plus particulièrement sur les traits immunitaires (Kraaijeveld & van Alphen 1994; Fellowes et al. 1998; Green et al. 2000; Kraaijeveld et al. 2001). Dans ce complexe, des variations génétiques de résistance des larves de *Drosophila melanogaster* Meigen en réponse à *Asobara tabida* (Nees) ont été mises en évidence et ces variations s'accompagnent d'un coût : une baisse du taux d'alimentation des larves (Green et al. 2000). Une autre étude sur le parasitoïde du puceron du pois *Aphidius ervi* a démontré des variations génétiques de résistance chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* Harris (Henter & Via 1995). La démonstration de la variation de virulence du parasitoïde reste plus difficile à démontrer et peu d'exemples existent dans la littérature (Kraaijeveld et al. 2001).

Système étudié

Harmonia axyridis Pallas

Systématique et distribution géographique.

Harmonia axyridis Pallas est une coccinelle de la famille des Coccinellidae et de la tribu des Coccinellini (Kovar 1996). Sa distribution originelle s'étend en Asie : Chine, Japon, Sibérie, Corée, Ex-URSS (Iablokoff-Khnzorian 1982). Suite à des introductions volontaires répétées aux États-Unis depuis 1916 (Chapin & Brou 1991; Tedders & Schaefer 1994) et certaines introductions possiblement accidentelles (Day et al. 1994), elle est maintenant établie en Amérique du Nord (Tedders & Schaefer 1994; Dreistadt et al. 1995; LaMana & Miller 1996; Colunga-Garcia & Gage 1998; Nault & Kennedy 2003) et notamment au Canada où elle a été observée pour la première fois au Québec en 1994 (Coderre et al. 1995). Elle est aussi présente en Europe depuis plusieurs années (Grèce, France, Belgique, Espagne, Royaume-Uni, etc) (Katsoyannos et al. 1997, Iperiti & Bertand 2001, Adriaens et al. 2003; Majerus & Roy 2005) et elle a été récemment observée en Amérique du sud (de Almeida & da Silva 2002). *Harmonia axyridis* est donc devenue cosmopolite.

Biologie et écologie

Harmonia axyridis est bivoltine aux États-Unis (LaMana & Miller 1996; Nault & Kennedy 2003) et se développe en quatre stades larvaires suivis d'un stade pupal. Les adultes peuvent vivre jusqu'à 170 jours (Hukushima & Kamei 1970) et les femelles ont une fécondité totale pouvant aller jusqu'à 3800 œufs par femelle (Hukushima & Kamei 1970). *Harmonia axyridis* est abondante dans les strates arbustives et herbacées des forêts, jardins, champs cultivés et en milieu urbain (Hodek 1973; Iablokoff-Khnzorian 1982; Chapin & Brou 1991; LaMana & Miller 1996; Brown & Miller 1998). Elle s'attaque à une grande diversité de proies : pucerons, lépidoptères, acariens, psylles et cochenilles (Iablokoff-Khnzorian 1982). C'est une espèce prédatrice généraliste.

Cette coccinelle démontre une forte propension à la prédation intraguilde, c'est-à-dire qu'elle consomme des œufs et larves d'autres espèces de coccinelles (Cottrell & Yeargan 1998; Yasuda & Ohnuma 1999; Yasuda et al. 2001; Cottrell 2004; Félix & Soares 2004; Snyder et al. 2004; Yasuda et al. 2004) ou de chrysope (Phoofolo & Obrycki 1998), même en présence de pucerons. Dans les régions où elle est invasive, ce comportement provoquerait en partie le déplacement d'autres espèces de coccinelles indigènes ou exotiques (Brown & Miller 1998; Michaud 2002; Brown 2003; Alyokhin & Sewell 2004). De plus, elle aurait un impact négatif sur des espèces non ciblées tel le papillon monarque *Danaus plexippus* L. (Koch et al. 2003; Koch et al. 2005). Ceci fait donc partie des nombreux effets non-désirés observés suite à l'établissement de *H. axyridis* en Amérique du Nord. Elle exprime aussi une hypsotaxie⁴ (Nalepa et al. 2005) et investit tous les ans, à l'automne, des bâtiments et maisons en milieu urbain comme agricole afin d'y passer l'hiver (Schaefer 2003; Huelsman & Kovack 2004). Elle est une source de mécontentement de la population en raison de son comportement d'agrégation automnale dans les maisons (Huelsman & Kovack 2004) et les cas d'allergies pour les humains (Yarbrought et al. 1999; Huelsman & Kovack 2004). Également, la contamination du goût du vin (Kovack 2004; Pickering et al. 2004) ainsi que des cas de phytophagies opportunistes sur des fruits (Koch et al. 2004a; Kovack 2004) provoquent le mécontentement des producteurs.

Les coccinelles possèdent des défenses chimiques et comportementales en réponse aux prédateurs qui peuvent les attaquer (Majerus 1994). Cependant, l'efficacité de ces défenses vis à vis des parasitoïdes n'a jamais été évaluée. Lorsque attaquée par un prédateur, *H. axyridis* produit un liquide jaunâtre malodorant qui perle par les articulations entre le fémur et le tibia des pattes. Ce liquide contient des substances odorantes répulsives et toxiques appelées alcaloïdes (Pasteels et al. 1973). Chez les larves, ce liquide est produit par des glandes situées en position dorsale. L'alcaloïde provoquant la mauvaise odeur est la pyrazine et ceux provoquant la toxicité chez *H. axyridis* sont l'harmonine et le 3-hydroxypiperidin-2-one (Alam et al. 2002). *Harmonia axyridis* peut aussi adopter des comportements agressifs envers d'autres coccinelles en situation de prédation intragilde. La fuite et les attaques avec mandibules sont les comportements que cette coccinelle exprime dans le but de minimiser sa mortalité en situation de prédation intragilde (Yasuda et al. 2001; Michaud 2002; Snyder et al. 2004; Yasuda et al. 2004; Sato et al. 2005).

Parasitisme

La communauté d'insectes parasitoïdes attaquant *H. axyridis* dans ses régions d'origine et d'introduction comprend uniquement des espèces de Diptères et d'Hyménoptères (tabl. E.1). *Strongygaster triangulifera* (Loew) et *D. coccinellae* sont les deux parasitoïdes les plus répandus en Amérique du Nord et pouvant s'attaquer à *H. axyridis* (tabl. E.1). Tous deux sont des parasitoïdes généralistes ; *S. triangulifera* est présent notamment en Ontario (Smith 1960) et *D. coccinellae* au Québec (Hudon 1959), mais aucune étude ne les rapporte comme parasitoïde de *H. axyridis* au Québec. *Strongygaster triangulifera* peut s'attaquer à plusieurs ordres d'insectes : Coleoptères, Lépidoptères, Dermaptères et Hémiptères (Sabrosky & Braun 1970), tandis que le parasitoïde *D. coccinellae* est confiné aux Coccinellidae de l'ordre des Coléoptères (Baldulf 1926).

⁴ Hypsotaxie : attirance vers les formes élevées.

Tableau E.1 : Liste des espèces de parasitoïdes attaquant *H. axyridis* et pourcentage de parasitisme issu de dissections dans les lieux d'origine ou d'introduction de *H. axyridis*.

Espèces	Stades cibles*	Lieu d'origine	Lieu d'introduction
<i>Strongygaster triangulifera</i> (Loew) ¹	Ad	Pas de données	-Caroline du Nord (ÉU) : 1,4-14,2% (1993-99) -Oregon (ÉU) : 11,4-15,4% (1993-94)
<i>Phalacrotophora</i> sp. ²	P	Japon : 4,9-18,6 % Corée : 0,4-6,7 % (1995)	Pas de données
<i>Medina</i> sp. ³	Ad	Pas de données	Pas de données
<i>Degeeria luctuosa</i> Meig. ⁴	Ad	Russie : 4,4% (1970), 3,7% (1972) Corée : 12,1-26,5% (1993); 0,7% (1994); 5,2% (1995)	Pas de données
<i>Tetrastichus</i> sp. ⁵	L & P	Pas de données	Pas de données
<i>Dimocampus coccinellae</i> Schrank ⁶	L, P & Ad	Japon : 1-11% Russie : 4,6-10,9% Chine : 10,4% Corée : 5,2%	-Minnesota (ÉU) : 23,8% (1999); 8,9% (2000) -Oregon (ÉU) : 1-2,8% (1993-94)

*Ad = Adulte ; P = Pupe et L = Larve. ¹ : LaMana & Miller (1996), Nalepa et al. (1996), Disney (1997), Katsoyannos & Aliniabee (1998), Nalepa & Kidd 2002; ² : Park et al. (1996), Osawa (1993); ³ : Hodek & Honěk (1996); ⁴ : Iablokoff-Khnzorian (1982), Park et al. (1996); ⁵ : Iablokoff-Khnzorian (1982); ⁶ : Maeta (1969), Iablokoff-Khnzorian (1982), Hodek & Honěk (1996), LaMana & Miller (1996), Park et al. (1996), Katsoyannos & Aliniabee (1998), Hoogendoorn & Heimpel (2002).

***Coleomegilla maculata lengi* Timberlake**

Systématique et distribution géographique.

Coleomegilla maculata lengi Timberlake est une coccinelle de la famille des Coccinellidae et de la tribu des Coccinellini. Elle est présente en Amérique du Nord et au nord de l'Amérique du Sud (Brésil) (Gordon 1985; Berti-Filho & Costa 1995; Krafur & Obrycki 2000). Elle a une distribution néarctique.

Biologie et écologie

Coelomegilla maculata a deux ou trois générations par an aux États-Unis (Obrycki & Tauber 1978) et les adultes ont une longévité de 77 jours en moyenne (Wright & Laing 1978). La fécondité totale de cette espèce peut aller jusqu'à 650 œufs (Gagné 1996). Cette espèce se retrouve principalement dans la strate herbacée, dans les cultures céréalières de maïs et de légumineuses ainsi que les vergers (Putman 1964; Coderre & Tourneur 1988; Groden et al. 1990; Kieckhefer & Elliot 1990; Giles et al. 1994). Elle s'alimente de pucerons, d'œufs de doryphore de la pomme de terre et de plusieurs lépidoptères, mais aussi de pollen (Conrad 1959; Smith 1961; Hodek 1973; Groden et al. 1990). C'est une espèce au régime alimentaire polyphage.

Parasitisme

Coleomegilla maculata est essentiellement attaquée par le parasitoïde *D. coccinellae* et elle reconnue pour être un de ses hôtes de prédilection en Amérique du Nord (Hodek & Honěk 1996). Le parasitisme par *D. coccinellae* varie beaucoup en fonction de la période de l'année, du lieu d'échantillonnage et de l'origine des individus (terrain ou laboratoire) (tabl. E.2). Il est à son maximum à la fin de l'automne et début de l'hiver sur les sites d'hivernation des adultes de *C. maculata* où il peut atteindre plus de 60% (Parker et al. 1977).

Tableau E.2 : Parasitisme de terrain et laboratoire de *C. maculata* par *D. coccinellae* en Amérique du Nord.

Localisation géographique	Parasitisme (%)	Échantillonnage	Références
ÉU - Minnesota	18,2% (1999) 14,5% (2000)	Terrain, % issu de dissection	Hoogendoorn & Heimpel (2002)
ÉU - Vermont	40% (sept. 1975) 23% (sept. 1976)	Terrain, % issu de dissection	Parker et al. (1977)
ÉU - Missouri	20% (1975-76)	Terrain, % issu de dissection	Richerson & DeLoach (1973)
ÉU - Oklahoma	24,1% (1978-79)	Terrain, % issu de dissection	Cartwright et al. (1982)
ÉU - Ohio	11,3% (1924)	Terrain, % issu de dissection	Baldulf (1926)
Canada - Ontario	36,5-54,6% (1977-78)	Terrain, % issu de dissection	Wright & Laing (1982)
ÉU - Iowa	34% (1988) 58% (1988)	Laboratoire, % issu d'émergence	Obrycki (1989); Orr et al. (1992)
ÉU - New York	40% (1984)	Laboratoire, % issu d'émergence	Obrycki et al. (1985)

***Dinocampus coccinellae* Schrank**

Systématique et distribution géographique.

Dinocampus coccinellae est un parasitoïde Hyménoptère de la famille des Braconidae et de la sous-famille des Euphorinae (Baldulf 1926). Il est aussi connu sous le nom de genre *Perilitus* (Baldulf 1926). Il est présent en Amérique du Nord et du Sud, Europe, Afrique du Nord, ex-URSS, Asie, Nouvelle-Zélande et dans les îles du Pacifique (Baldulf 1926; Berti-Filho & Costa 1995; Hodek & Honěk 1996; Shahadi et al. 2002). Ce parasitoïde a donc une distribution cosmopolite. L'origine géographique des lignées de *D. coccinellae* présentes en Amérique du Nord reste cependant inconnue et les articles publiés récemment considèrent ce parasitoïde comme étant indigène à l'Amérique du Nord (Hoogendoorn & Heimpel 2002).

Biologie et écologie

Dinocampus coccinellae est un endoparasitoïde solitaire koïnobionte (Baldulf 1926); la femelle pond un seul œuf dans un hôte, lequel continue à se développer après la ponte. Ce parasitoïde réalise quatre à cinq générations par an en Ontario (Wright & Laing 1982). *Dinocampus coccinellae* parasite les stades adultes, pupaux ou larvaires des coléoptères Coccinellidae de la tribu des Coccinellini. Pouvant parasiter environ 30 espèces de coccinelles, *D. coccinellae* est considéré comme un parasitoïde généraliste (tabl. E.3). Chez *D. coccinellae*, aucun mâle n'est produit, les femelles étant produites par parthénogenèse thélytoque (Baldulf 1926). L'œuf éclot en cinq jours, puis le parasitoïde immature passe par quatre stades larvaires durant 12 jours. La larve de dernier stade émerge ensuite de la coccinelle par les derniers sternites abdominaux et tisse alors un cocon sur lequel l'hôte reste accroché et meurt; l'adulte émerge sept jours plus tard (fig. E.2). Les œufs de *D. coccinellae* libèrent environ 550 tératocytes d'une taille moyenne de 47 microns lors de l'éclosion dans l'hémolymphe des coccinelles (Sluss 1968; Sluss & Leutenegger 1968; Kadono-Okuda et al. 1995). Ces cellules ont essentiellement une fonction de nutrition chez *D. coccinellae* car celles-ci sont ingérées au fur à mesure du développement du parasitoïde immature (Sluss & Leutenegger 1968; Kadono-Okuda et al. 1995; Kadono-Okuda et al. 1998). Des autres fonctions possibles, telles la sécrétion et l'immunosuppression, n'ont pour l'instant pas été mises en évidence.

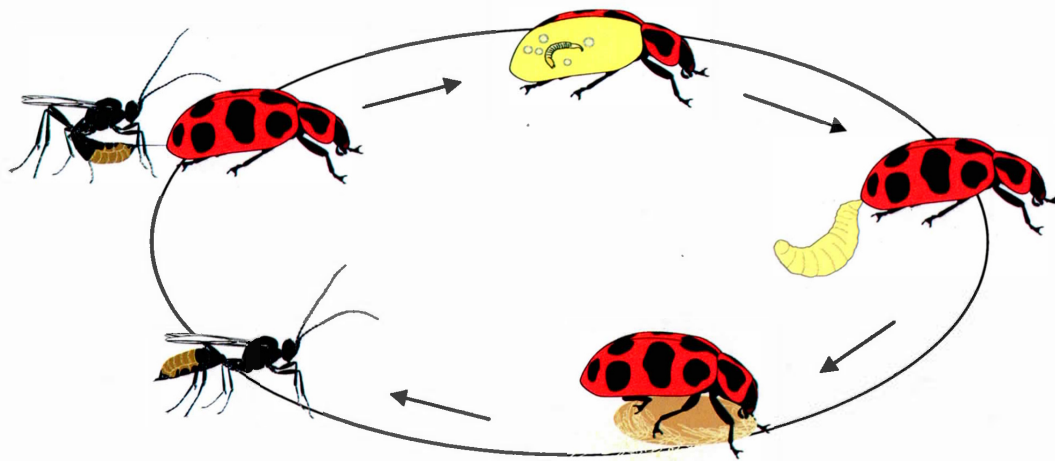


Figure E.2 : Cycle de vie de *D. coccinellae* dans *C. maculata*.

Tableau E.3: Liste des espèces hôtes de *Dinocampus coccinellae* et de leur localisation géographique (Tiré de Hodek & Honěk 1996 et Majerus 1997).

Espèces hôtes	Localisation
<i>Adalia bipunctata</i>	Canada
<i>Adonia variegata</i>	Europe, Chine
<i>Coccinella divaricata (distincta)</i>	Europe
<i>Coccinella novemnotata</i>	États-Unis, Canada
<i>Coccinella quinquepunctata</i>	Europe
<i>Coccinella repanda</i>	Formose
<i>Coccinella sanguinea</i>	États-Unis
<i>Coccinella septempunctata</i>	États-Unis, Canada, Europe, Chine
<i>Coccinella septempunctata bruckii</i>	Japon
<i>Coccinella trifasciata perplexa</i>	Canada
<i>Coccinella undecimpunctata</i>	Égypte
<i>Coccinella undecimpunctata aegyptiaca</i>	États-Unis, Canada
<i>Coleomegilla maculata lengi</i>	États-Unis, Canada
<i>Coleophora inaequalis</i>	Hawaii
<i>Eocaria muiri</i>	Japon
<i>Harmonia arcuata</i>	Formose
<i>Harmonia axyridis</i>	Japon, Chine, États-Unis
<i>Harmonia quadripunctata</i>	Europe
<i>Hippodamia convergens</i>	États-Unis
<i>Hippodamia parenthesis</i>	États-Unis
<i>Hippodamia tredecimpunctata</i>	États-Unis
<i>Lemnia biplagiata</i>	Formose
<i>Macronaemia hauseri</i>	Chine
<i>Menochilus sexmaculatus</i>	Formose
<i>Miraspis discolor</i>	Formose
<i>Olla abdominalis</i>	États-Unis
<i>Propylea japonica</i>	Japon
<i>Propylea quatuordecimpunctata</i>	Europe, États-Unis
<i>Semiadalia undecimnotata</i>	Europe
<i>Synharmonia conglobata</i>	Europe

Les femelles possèdent environ 100 œufs par ovaire deux jours après l'émergence et pourraient en pondre de 200 à 400 durant toute leur vie (Baldulf 1926). Le superparasitisme⁵ est courant, mais seul un adulte émerge par hôte, les individus surnuméraires étant éliminés par des combats larvaires (Baldulf 1926; Sluss 1968; Wright & Laing 1978). La femelle est incapable de discrimination polygyne et sa capacité discriminatoire monogyne n'est que de quelques minutes (2 à 4 min.) (Okuda & Ceryngier 2000). L'espèce, l'âge, le sexe, la forme du corps, la couleur, la mobilité, le stade de développement, la signature chimique, l'état sain vs parasité sont les caractéristiques des hôtes qui vont influencer le choix de *D. coccinellae* et qui vont déterminer sa préférence pour un type d'hôte (Walker 1961; Richerson & DeLoach 1972; Orr et al. 1992; Geoghegan et al. 1998; Majerus et al. 2000; Okuda & Ceryngier 2000; Al Abassi et al. 2001; Davis et al. 2006). Même avec un large spectre d'hôte, *D. coccinellae* affiche des préférences locales envers certaines espèces: la coccinelle à sept points (*Coccinellae septempunctata bruckii*) en Asie et en Europe, la coccinelle maculée (*C. maculata*) et la coccinelle convergente (*H. convergens*) en Amérique du Nord (Hodek & Honěk 1996).

Le choix de la coccinelle *C. maculata* comme coccinelle indigène de référence dans cette étude s'est fait sur la base de la littérature stipulant que *C. maculata* représente un hôte adéquat pour le développement du parasitoïde *D. coccinellae*. Ce choix a été renforcé par la présence abondante de cette espèce dans les cultures au Québec ainsi que sa facilité d'élevage en laboratoire.

Interaction *H. axyridis*-*D. coccinellae* : est-ce réellement une nouvelle association?

Dinocampus coccinellae et *H. axyridis* sont présents tous les deux en Asie comme en Amérique du Nord. La souche asiatique de *H. axyridis* fait donc partie du spectre d'hôtes de la souche asiatique de *D. coccinellae*. Cependant, nous n'avons aucun indice que la souche américaine de *D. coccinellae* est identique à la souche asiatique *D. coccinellae*. Également, aucune preuve n'existe que les coccinelles exotiques aient été transportées en Amérique du

⁵ Superparasitisme : ponte de plusieurs œufs dans un même hôte soit par la même femelle (monogyne) ou par des femelles différents (polygyne).

Nord avec le parasitoïde lors de leur introduction. La majorité des études ayant impliqué *H. axyridis* et *D. coccinellae* n'ont jamais envisagé de tracer l'origine des populations de *D. coccinellae* américaines vs asiatiques. Également, l'étude bionomique de Baldulf (1926) mentionne que les populations de *D. coccinellae* d'Amérique du Nord sont soit originaires de ce continent soit d'origine européenne.

Si la relation *H. axyridis*-*D. coccinellae* est une nouvelle association, comme nous l'avons postulé tout au long de notre étude, nos résultats illustrent donc l'absence d'adaptation du parasitoïde à ce nouvel hôte qui apparaît marginal pour ce parasitoïde. Pour l'instant, cette coccinelle est donc située dans le bas du spectre d'hôtes de ce parasitoïde en Amérique du Nord. Cela laisse la porte ouverte à des spéculations sur l'évolution de la relation étant donné que les densités de populations de *H. axyridis* en Amérique du Nord sont particulièrement élevées mais également parce que *H. axyridis* occupe une place de coccinelle prédatrice dominante dans la guildes des coccinelles en Amérique du Nord comparativement à la situation qui prévaut au Japon où elle partage l'habitat avec une autre coccinelle dominante, la coccinelle à sept points (Yasuda & Shinya 1997).

Dans le cas peu probable où les populations de *D. coccinellae* d'Amérique du Nord seraient originaires d'Asie, elles représenteraient actuellement des écotypes différents. L'écotype Nord Américain de *D. coccinellae* ayant évolué sans la présence de *H. axyridis* serait donc aujourd'hui face à ce nouvel hôte et représenterait alors une nouvelle association.

CHAPITRE 1

**First report of *Harmonia axyridis* Pallas being attacked by *Dinocampus coccinellae*
Schrank in Canada**

Annabelle Firlej, Guy Boivin, Eric Lucas & Daniel Coderre

Biological Invasions (2005) 7: 553-556

RÉSUMÉ

Le parasitisme par *Dinocampus coccinellae* Schrank (Hymenoptera : Braconidae) de deux coccinelles, une espèce récemment introduite, *Harmonia axyridis* Pallas, et une espèce indigène, *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake, a été observé dans le sud-ouest du Québec. Les coccinelles adultes ont été échantillonnées de juin à septembre 2002 dans des champs de luzerne et de maïs. Les taux de parasitisme ont été obtenus par dissection et élevage des coccinelles en conditions contrôlées. La proportion moyenne de coccinelles avec une larve de parasitoïde était de 4,6% pour *H. axyridis* et de 32 % pour *C. maculata* mais 0% des *H. axyridis* et 5,9% des *C. maculata* étaient parasitées avec succès. En juillet, les coccinelles *C. maculata* étaient plus parasitées que les coccinelles *H. axyridis* et parmi les individus disséqués, les *C. maculata* étaient plus fréquemment superparasités que les *H. axyridis*. Nos résultats suggèrent que *D. coccinellae* n'est pas bien adapté à *H. axyridis* au Québec. C'est la première mention de *H. axyridis* attaquée par *D. coccinellae* au Canada.

MOTS-CLEFS : *Coleomegilla maculata lengi*, *Dinocampus coccinellae*, Espèces exotiques, Taux de parasitisme, Première mention, *Harmonia axyridis*.

ABSTRACT

Field parasitism of two lady beetles, a recently introduced species, *Harmonia axyridis* Pallas, and an indigenous species, *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake, by *Dinocampus coccinellae* Schrank (Hymenoptera: Braconidae) was investigated in southwestern Quebec. Adult coccinellids were sampled from June to September 2002 in alfalfa and cornfields. Parasitism rates were recorded by dissection and rearing of coccinellids in controlled condition. The average proportion of coccinellids with a parasitoid larva was 4.6% for *H. axyridis* and 32% for *C. maculata* but 0% of *H. axyridis* and 5.9% of *C. maculata* were successfully parasitized. In July, more *C. maculata* than *H. axyridis* were found to be parasitized and among all individuals dissected, *C. maculata* were more frequently found superparasitized than *H. axyridis*. Our results suggest that *D. coccinellae* is not well adapted to *H. axyridis* in Quebec. This is the first mention of *H. axyridis* being attacked by *D. coccinellae* in Canada.

KEY-WORDS: *Coleomegilla maculata lengi*, *Dinocampus coccinellae*, Exotic species, Field parasitism rate, First record, *Harmonia axyridis*.

INTRODUCTION

Classical biological control, the introduction of non-indigenous species to control exotic pests, has been used in North America for over 100 years but with variable success. The introduction of exotic species can have both ecological and genetic impacts on native communities (Simberloff and Stiling 1996; Mooney and Cleland 2001; Sakai et al. 2001; Lee 2002). An exotic coccinellid, *Harmonia axyridis* Pallas, was introduced in the United States from Asia in 1916 and repeatedly introduced again from 1979 to 1986 (Teddars and Schaefer 1994). A few years after its introduction, *H. axyridis* was established in southeastern United States (Chapin and Brou 1991) and spread up to northeastern United States and Quebec where it was first observed in 1994 (Coderre et al. 1995). There are still some doubts as to which *H. axyridis* population became established in North America, and an accidental seaport introduction remains possible (Day et al. 1994). This species has invaded several habitats and exerts a strong pressure on both native and exotic coccinellid species through intraguild predation (Cottrell and Yeargan 1998; Burgio et al. 2002) and competition by exploitation of the same resource (Brown and Miller 1998; Colunga-Garcia and Cage 1998). *Harmonia axyridis* is also considered a nuisance in North America because it overwinters in houses and buildings, causing structural damage and unpleasant odour and allergies (Teddars and Schaefer 1994; Nalepa et al. 1996; Yarbrought et al. 1999).

While native natural enemies are not expected to affect the establishment and dispersion of exotic species in the early stage of invasion, they could later reduce the impact of an exotic species by regulating its populations through local adaptation (Crawley 1989; Shea and Chesson 2002). Therefore, parasitism rate by native natural enemies present in the region where *H. axyridis* has recently become established could potentially increase locally. Only two parasitoid species were recorded to attack *H. axyridis* in North America: the Diptera *Strongygaster triangulifera* (Loew) and the Hymenoptera *Dinocampus coccinellae* Schrank (Nalepa et al. 1996; Katsoyannos and Aliniaze 1998; Hoogendoorn and Heimpel 2002; Nalepa and Kidd 2002). *Strongygaster triangulifera* is an indigenous North American parasite of Coleoptera (Thompson 1954) and, to a lesser extent, of Lepidoptera, Dermaptera and Hemiptera (Sabrosky and Braun 1970). It successfully emerged from 4% of *H. axyridis* adults in North America (Katsoyannos and Aliniaze 1998, Nalepa and Kidd 2002). In

central Canada (Ontario), its presence was recorded on *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake and *Coccinella trifasciata perplexa* Mulsant (Smith 1960) but no parasitism on *H. axyridis* was mentioned in Ontario and Quebec.

Dinocampus coccinellae is a generalist parasitoid of nearctic and palearctic coccinellids (Hodek and Honěk 1996) and, in North America, *C. maculata* is its preferred host (Hudon 1959; Smith 1960; Parker et al. 1977; Obrycki and Tauber 1979). Parasitism of *H. axyridis* by *D. coccinellae* has rarely been recorded in North America (Nalepa et al 1996; Hoogendoorn and Heimpel 2002) or Japan (Maeta 1969), and Hoogendoorn and Heimpel (2002) suggest that *H. axyridis* represents an egg-sink for *D. coccinellae* because of a high rate of unsuccessful development. The recent establishment of *H. axyridis* in Canada, in 1994, represents an opportunity to study the evolution of the host-parasitoid relation between *H. axyridis* and *D. coccinellae*. In this study, we report field parasitism rates of *D. coccinellae* on the native species *C. maculata* and the exotic species *H. axyridis* in Quebec. We predict that parasitism of *H. axyridis* should be lower compared to what is observed in the native host *C. maculata* because of the relative novelty of the association with *H. axyridis*.

MATERIALS AND METHODS

From the 20th June to 17th September 2002, adults of *H. axyridis* and *C. maculata* were collected once per month in three different fields of two of the most abundant crops in the Montérégie area (Quebec): alfalfa (*Medicago sativa* L.) and corn (*Zea m̃idis* L.). Alfalfa fields were sampled from June to July, and corn fields from August to September because of the differential abundance of aphids. From 3 to 30 km separated each fields depending of the locality. All coccinellids were collected systematically with a vacuum by random sampling of plants situated from the edges to 50 meters inside fields. Occasionally, coccinellids were also captured on various weeds in the edge of those fields (*Asclepias syriaca* L., *Taraxacum officinale* Weber, *Dactylis glomerata* L., *Trifolium repens* L., *Phalaris arundinacea* L., *Bromus inermis* Leyss, *Phleum pratense* L., *Daucus carota* L.).

In each field, the collection was stopped once 100 adults of each species of coccinellids had been captured or until two hours had elapsed. As the presence of eggs or larvae of *D. coccinellae* in coccinellid adults is impossible to detect by visual observation of adults, the total parasitism by *D. coccinellae* was determined by dissection, and the successful parasitism by rearing the captured adults. Half the adults collected were then frozen at -10°C and dissected under a stereomicroscope (x 200) to record the presence and number of *D. coccinellae* eggs or larvae and the presence of black larvae (dead). The others were reared to determine the successful development of *D. coccinellae*. These adults were reared in plastic boxes (270 mL) and provided with pollen, artificial diet (Coderre, unpublished), aphids *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and water at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The presence of parasitoid cocoons was monitored every two days and the experiment was stopped after 30 days at which time the development of *D. coccinellae* should have been completed (Wright and Laing 1978; Obrycki 1989).

Chi-square analysis was performed to compare the total and the successful rate of parasitism between *H. axyridis* and *C. maculata*. We also performed Chi-square analysis to compare the observed percentage of coccinellids with more than one larva to expected (Sokal and Rohlf 1981).

RESULTS AND DISCUSSION

The numbers of adults dissected and reared were respectively 453 and 489 for *H. axyridis* and 521 and 472 for *C. maculata*. The total parasitism rate for *H. axyridis* (4.6%) was significantly lower than for *C. maculata* (32.1%) ($\chi^2=117$; df=1, 972; $p<0.0001$). The successful parasitism rate was also significantly lower for *H. axyridis* (0%) than for *C. maculata* (5.9%) ($\chi^2=25.1$; df=1, 972; $p<0.0001$). Superparasitism (when more than one larva of *D. coccinellae* was present in a host) was found in 30.5% of the parasitized *C. maculata* individuals, and in only 4.8% of the parasitized *H. axyridis*. The observed percentages were not different from those expected (30.8% and 4.4% respectively) ($\chi^2=1.02$; df=1, 103; $p=0.989$). A maximum of five larvae were observed in *C. maculata*. Significant differences in the level of total parasitism between *H. axyridis* and *C. maculata* appeared in June, July and August but, in September, rates were similar for the two species (tabl. 1.1). The maximum

total parasitism for *C. maculata* occurred in July, with 55% of individuals sample found to be parasitized.

Table 1.1: Monthly data on parasitism of *H. axyridis* and *C. maculata* by *D. coccinellae* as determined by dissection. Parasitism rates were compared between species within a month using a Chi-square test ($p < 0.05$).

<i>Month</i>	<i>H. axyridis</i>	<i>C. maculata</i>	χ^2	<i>P</i>
June	6.00 \pm 23.90	27.50 \pm 44.76	10.377	0.0013
July	2.97 \pm 17.06	55.04 \pm 49.94	70.377	<0.0001
August	2.67 \pm 16.16	40.48 \pm 49.68	48.150	<0.0001
September	7.24 \pm 8.26	16.00 \pm 36.78	2.426	0.1193

Our results confirm that *C. maculata* is an important host for *D. coccinellae* (Hudon 1959; Obrycki and Tauber 1979; Obrycki et al. 1985). The rate of total parasitism of *C. maculata* that we observed (32.1%) is higher than those reported in the studies of Parker et al. (1977) (11%) and Hoogendoorn and Heimpel (2002) (17.4%). These differences stress the fact that there are considerable variations in the rate of parasitism by *D. coccinellae* according to the localities and the season where and when the hosts were sampled (Hodek 1973). Our results reflect only one pattern of parasitism observed in 2002 in two cultures (corn and alfalfa) of this area.

We have observed parasitoid larvae surrounded by a thick melanotic capsule or dead larvae with melanotic spots on their body that could be the result of an immune response mounted by the host. However, because of the low level of such reactions both in *H. axyridis* (1.8%) and in *C. maculata* (7.1%), they are not considered to be an important factor in reducing the success of parasitism. However, the presence of surnumerous larvae could have decreased the *C. maculata* host quality and provoked an early host death explaining one part of the difference between the total and the successful parasitism rate in *C. maculata*.

Although *D. coccinellae* attacks more than 40 coccinellid species in the world, some variation appears in the degree of parasitism observed on those different species. All hosts are not equally suitable for the development of *D. coccinellae*. *Dinocampus coccinellae* does not seem to be well adapted to the Quebec population of *H. axyridis* as indicated by the low rate of parasitism (4.9%) observed in Quebec. This level of parasitism is lower than that which has been observed in Minnesota by Hoogendoorn and Heimpel (2002) (23.8% in 1999 and 8.9% in 2000).

All *D. coccinellae* immatures were unable to develop successfully in *H. axyridis* hosts which support the hypothesis of Hoogendoorn and Heimpel (2002) that *H. axyridis* represents a sink for *D. coccinellae* eggs and that, at the moment, *D. coccinellae* has no impact on *H. axyridis* populations. However, it is likely that parasitism of *H. axyridis* by *D. coccinellae* will evolve and eventually result in higher rates and successful larval development. The abundance of *H. axyridis* in Quebec, its competitiveness in the coccinellid guild and its availability as a potential host are all factors that could act on the probability that *D. coccinellae* will eventually parasitize successfully this species.

REFERENCES

- Brown MW and Miller SS (1998) *Coccinella* (Coleoptera) in apple orchards of eastern west Virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. *Entomological News* 109: 136-142
- Burgio G, Santi F and Maini S (2002) On intra-guild predation and cannibalism in *Harmonia axyridis* (Pallas) and *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 24: 110-116
- Chapin JB and Brou VA (1991) *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). *Proceeding of the Entomological Society of Washington* 93: 630-635
- Coderre D, Lucas E and Gagné I (1995) The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera : Coccinellidae) in Canada. *Canadian Entomologist* 127: 609-611
- Colunga-García M and Gage SH (1998) Arrival, establishment, and habitat use of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) in a Michigan landscape. *Environmental Entomology* 27: 1574-1580
- Cottrell TE and Yeargan KV (1998) Intraguild predation between an introduced lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), and a native lady beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 71: 159-163
- Crawley MJ (1989) Chance and timing in biological invasions. In J.A. Drake JA, Mooney HA, di Castri F, Groves RH, Kruger FJ, Rejmánek M and Williamson M (eds) *Biological invasions: a global perspective*, pp 407-423. John Wiley & Sons, New York, NY
- Day WH, Prokrym WH, Ellis DR and Chianese RJ (1994) The known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in eastern North America. *Entomological News* 105: 244-256
- Hodek I (ed) (1973) *Biology of Coccinellidae*. Academia, Prague, 291 p
- Hodek I and Honěk A (eds) (1996) *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 480 p
- Hoogendoorn M and Heimpel GE (2002) Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. *Biological Control* 25: 224-230
- Hudon M (1959) First record of *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae) as a parasite of *Coccinella novemnotata* Hbst. and *Coleomegilla maculata* lengi Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Canada. *Canadian Entomologist* 91: 63-64
- Katsoyannos P and Aliniaze MT (1998) First record of *Strongygaster triangulifera* (Loew) (Diptera: Tachinidae) as a parasitoid of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in western North America. *Canadian Entomologist* 130: 905-906
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 386-391
- Maeta Y (1969) Biological studies on the natural enemies of some Coccinellid beetles. I. On *Perilitus coccinellae* (Schrank). *Kontyû* 37: 147-166
- Mooney HA and Cleland EE (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proceeding of the National Academy of Science of USA* 98: 5446-5451

- Nalepa CA and Kidd KA (2002) Parasitism of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) by *Strongygaster triangulifera* (Diptera: Tachinidae) in North Carolina. *Journal of Entomological Science* 37: 124-127
- Nalepa CA, Kidd KA and Ahlstrom KR (1996) Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. *Annals of the Entomological Society of America* 89: 681-685
- Obrycki JJ (1989) Parasitization of native and exotic coccinellids by *Dinocampus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 62: 211-218
- Obrycki JJ and Tauber MJ (1979) Seasonal synchrony of the parasite *Perilitus coccinellae* and its host *Coleomegilla maculata*. *Environmental Entomology* 8: 400-405
- Obrycki JJ, Tauber MJ and Tauber CA (1985) *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae): Parasitization and development in relation to host-stage attacked. *Annals of the Entomological Society of America* 78: 852-854
- Parker BL, Whalon ME and Warshaw M (1977) Respiration and parasitism in *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 70: 984-987
- Sabrosky CW and Braun BH (1970) A tachinid parasite of fireflies (Diptera: Tachinidae; Coleoptera: Lampyridae) *Entomological News* 81: 185-187
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN and Weller SG (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305-332
- Shea K and Chesson P (2002) Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 17:170-176
- Simberloff D and Stiling P (1996) Risk of species introduced for biological control. *Biological Conservation* 78: 185-192
- Smith BC (1960) Note on parasitism of two coccinellids, *Coccinella trifasciata perplexa* Muls. and *Coleomegilla maculata lengi* Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. *Canadian Entomologist* 92: 652
- Sokal RR and Rohlf FJ (1981) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. WH Freeman and company, New York, NY, 859 p
- Tedders WL and Schaefer PW (1994) Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae) in the southern United States. *Entomological News* 105: 228-243
- Thompson WR (1954) *Hyalomyodes triangulifera* Loew. (Diptera, Tachinidae). *Canadian Entomologist* 86: 137-144
- Wright EJ and Laing JE (1978) The effects of temperature on development, adult longevity and fecundity of *Coleomegilla maculata lengi* and its parasite *Perilitus coccinellae*. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* 109: 33-47
- Yarbrought JA, Armstrong JL, Blumberg MZ, Phillips AE, McGahee E and Dolen WK (1999) Allergic rhinoconjunctivitis caused by *Harmonia axyridis* (Asian ladybeetles, Japanese lady beetle, or lady bug). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104: 704-705

Le chapitre 1 a permis de mettre en évidence le parasitisme de la coccinelle indigène *C. maculata* et de la coccinelle exotique *H. axyridis* par *D. coccinellae* au Québec. Cette étude a démontré que même si les deux hôtes sont échantillonnés en même temps sur une même culture, le parasitisme diffère, l'hôte exotique étant beaucoup moins susceptible à *D. coccinellae*. Afin de déterminer quels facteurs sont à l'origine de cette faible susceptibilité, nous nous sommes intéressés à la présence de barrières comportementales qui pourraient intervenir pendant la phase de sélection de l'hôte et qui réduiraient le succès de parasitisme. En effet, lors de la rencontre entre un hôte et un parasitoïde, des défenses comportementales peuvent augmenter son temps de manipulation et diminuer l'oviposition du parasitoïde. Les comportements défensifs de *H. axyridis* envers des coccinelles prédatrices ont fait l'objet d'études précédentes et ont démontré que *H. axyridis* est une espèce particulièrement agressive, avec des défenses comportementales efficaces en situation de prédation intragilde. Cependant, rien n'est connu quant à l'expression de ces défenses face à un parasitoïde. L'étude de l'effet des défenses comportementales de *H. axyridis* envers *D. coccinellae* fait donc l'objet du chapitre 2.

CHAPITRE 2

Impact of host behavioural defences on an indigenous parasitoid preference

Annabelle Firlej, Eric Lucas, Daniel Coderre & Guy Boivin

En préparation pour Biological Control

RÉSUMÉ

Quand les parasitoïdes attaquent une nouvelle espèce hôte exotique, ils doivent surmonter différentes barrières dont les comportements de défense. Nous présentons ici des données sur l'effet des comportements défensifs d'un hôte exotique sur le comportement et l'oviposition d'un parasitoïde indigène. Nous avons mesuré l'effet des comportements défensifs de l'hôte exotique, *Harmonia axyridis*, et de l'hôte indigène, *Coleomegilla maculata*, sur le temps de manipulation, la préférence d'attaque et l'oviposition par le parasitoïde indigène, *Dinocampus coccinellae*. Les parasitoïdes femelles étaient confrontées à un choix interspécifique, entre des adultes ou des larves des deux hôtes exotique et indigène, et à un choix intraspécifique entre les stades larvaires et adultes de l'hôte exotique. Les résultats ont montré que les comportements de défense des adultes de l'hôte exotique étaient plus efficaces contre le parasitoïde que ceux exprimés par l'adulte de l'hôte indigène ou par la larve de l'hôte exotique. Ces comportements défensifs augmentent significativement le temps de manipulation des femelles parasitoïdes. Même si les adultes de l'hôte exotique exhibent des comportements de défense efficaces, la femelle parasitoïde ne démontre pas une préférence d'attaque inférieure pour les adultes de l'hôte exotique comparé aux adultes de l'hôte indigène et aux larves de l'hôte exotique. Peu d'œufs ont été trouvés dans les adultes de l'espèce exotique après cinq jours d'incubation, suggérant une faible adéquation de l'hôte adulte. Nos résultats suggèrent que les informations utilisées pour l'acceptation de l'hôte par le parasitoïde généraliste *D. coccinellae* sont inadéquates pour évaluer l'adulte de l'hôte exotique *H. axyridis*. Ces résultats fournissent un exemple d'espèce invasive représentant un piège évolutive pour *D. coccinellae*.

MOTS-CLEFS : Relation hôte-parasitoïde, Comportements de défense, Invasion biologique.

ABSTRACT

When parasitoids attack new exotic host species, they must deal with barriers at various levels, and the host behavioural defences represent one of those steps to overcome. We present here data on the impact of an exotic host behavioural defence on the behaviour and oviposition of an indigenous parasitoid. We measured the effect of defensive behaviours of the exotic host, *Harmonia axyridis*, and the indigenous one, *Coleomegilla maculata*, on the handling time, attack preference and oviposition of the indigenous parasitoid, *Dinocampus coccinellae*. Female parasitoids were offered interspecific choice tests, between adults or larvae of both exotic and indigenous hosts, and intraspecific choice tests between larval and adult stage of the exotic host. Results showed that the defensive behaviours of the adults of the exotic host were more effective against the parasitoid than those expressed by the adults of the indigenous host or the larvae of the exotic host. These defensive behaviours increased significantly the female parasitoid handling time. Although the adults of the exotic hosts exhibited more effective defensive behaviours, the female parasitoid did not demonstrate lower attack preference for the adults of the exotic host compared to adults of the indigenous adult or for adults over larvae of the exotic host. Very few eggs were recovered from adults of the exotic host after five days of incubation, suggesting low host suitability. Our results suggest that the host acceptance cues used by the generalist parasitoid *D. coccinellae* are inadequate to evaluate suitability of *H. axyridis* adults as hosts. These results provide evidence for an evolutionary trap by an invasive species for *D. coccinellae*.

KEY-WORDS: Host-parasitoid relationship, Behavioural defences, Biological invasion.

INTRODUCTION

In the context of biological invasions, new host-parasitoid interactions may occur and both theory (Keane & Crawley, 2002) and empirical data (Aliabadi & Juliano, 2002; Torchin *et al.*, 2002; Torchin *et al.*, 2003; Torchin & Mitchell, 2004; Toepfer & Kuhlmann, 2004; Krakau *et al.*, 2006) suggest that exotic hosts could escape from indigenous parasitoids in their new environment. When indigenous parasitoids encounter a new host species, they may respond to cues not necessarily linked to adapted outcome (Payne *et al.*, 2004) and exotic species could then represent an evolutionary trap for indigenous species, reducing their survival and reproductive output (Schlaepfer *et al.*, 2005). Barriers preventing indigenous parasitoids from attacking exotic hosts may be ecological, behavioural and/or physiological (Prenter *et al.*, 2004). The host defensive behaviours must be first overcome by parasitoid females to successfully parasitize a host (Gross, 1993; Godfray, 1994). How the defensive behaviours of a new exotic host influence the behaviour of an indigenous parasitoid is the main question we address in this study.

Host choice by female parasitoids is influenced by the female's physiological status, environmental conditions, and the female's ability to assess host quality (van Alphen & Vet, 1986; Collins & Dixon, 1986; Mangel, 1989; Visser, 1995; Rivero, 2000). The perceptual assessment of host quality is based on various host characteristics such as its size, shape, colour, age, sex and defences (Vinson, 1976; van Alphen & Vet, 1986; Godfray, 1994). Host behavioural defences can have a direct impact on the parasitoid's individual fitness by increasing the host handling time, thereby causing a decrease in the instantaneous rate of fitness gain (Gerling *et al.*, 1990; Gross, 1993; Völkl & Stadler, 1996; De Farias & Hopper, 1999; Walker & Hoy, 2003). In some cases, behavioural defences can harm or kill a parasitoid female (Potting *et al.*, 1999). Host behavioural defences thus affect host acceptance, can decrease the rate of parasitism and can eventually shape the parasitoid's host-preference (Gross, 1993). To our knowledge, the implications of host behavioural defences on exotic host - indigenous parasitoid interactions have never been investigated.

Active host defensive behaviours are usually divided into two categories (Gross, 1993; Godfray, 1994). Behaviours that allow host to escape from a parasitoid female, such as

aphids that evade parasitoids by walking away or dropping off the plant (Dill *et al.*, 1990; Chau & Mackauer, 1997; Losey & Denno, 1998; Braendle & Weisser, 2001), are categorized as evasive behaviours. Behaviours that drive away, disable or even kill parasitoid females are categorized as aggressive behaviours. For example, caterpillars defend themselves aggressively by jerking their head, regurgitating, spitting and biting (Lederhouse, 1990; Potting *et al.*, 1999; Gentry & Dyer, 2002; Singer & Stireman, 2003) and can cause up to 25% mortality in parasitoid females (Potting *et al.*, 1999). Despite some studies have examined behavioural defences at the interspecific host level (Chau & Mackauer, 2001), the link between host defensive behaviours and parasitoid female preference has been mostly studied at the intraspecific host level by comparing parasitoid preference among host stages differing in their behavioural defences (Cornell *et al.*, 1987; Allen, 1990; Gerling *et al.*, 1990; Chau & Mackauer, 1997, 2000; Walker & Hoy, 2003). Moreover, many studies used single host-choice experimental design, better adapted to the evaluation of host suitability and thus more prone to erroneous conclusions regarding host preferences (Mansfield & Mills, 2004).

Here, we measured the influence of the host behavioural defences expressed by one exotic species, *Harmonia axyridis* Pallas, and an indigenous species, *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake on parasitism by a generalist indigenous parasitoid, *Dinocampus coccinellae* Schrank. This model enabled us to compare the effect of the behavioural defences of an exotic host species and an indigenous one on parasitism by an indigenous parasitoid in the context of biological invasion. As the parasitoid attack both larvae and adult stage of coccinellids (Obrycki *et al.*, 1985), we compared also the effect of behavioural defenses of larvae vs adult of the exotic host on the parasitoid. The Asiatic multicoloured lady beetle, *H. axyridis*, was introduced in the early 20th century in southern United States for biological control purpose (Teddars & Schaefer, 1994) and has since invaded North America (Chapin & Brou, 1991; Tedders & Schaefer, 1994; Colunga-Garcia & Gage, 1998). The twelve-spotted ladybeetle, *C. maculata*, is an indigenous coccinellid species in North America (Gordon, 1985) and co-occurs in some habitat with *H. axyridis* (Musser & Sheldon, 2003; Hoogendoorn & Heimpel, 2004). The parasitoid *D. coccinellae* is a generalist Braconidae with a wide host range that includes nearly 30 coccinellid species (Hodek & Honěk, 1996). In Quebec, *C. maculata* shows a high level of parasitism by *D. coccinellae* (32.1%) contrary to

H. axyridis (4.6%) (Firlej *et al.*, 2005). *Harmonia axyridis* shows a low susceptibility to pathogens, nematodes, parasitoids and predators in North America (LaMana & Miller, 1996; Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Nalepa & Kidd, 2002; Cottrell & Shapiro-Ilan, 2003; Koch, 2003; Firlej *et al.*, 2005; Shapiro-Ilan & Cottrell, 2005). In intraguild interactions against heterospecific coccinellids, *H. axyridis* expresses evasive and aggressive behaviours and performs mortal attacks with mandibles (Yasuda *et al.*, 2001; Michaud, 2002; Snyder *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005), but whether it displays defensive behaviours against parasitoids has not been documented.

In this paper, we investigated the influence of host behavioural defences on the host handling time, the female attack preference and oviposition of *D. coccinellae* using paired-choice tests at both the interspecific level (*D. coccinellae* with a choice among *C. maculata* and *H. axyridis* as either larvae or adults) and intraspecific level (*D. coccinellae* with a choice among larvae and adults of *H. axyridis*).

MATERIALS AND METHODS

Coleomegilla maculata, *H. axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *D. coccinellae* (Braconidae: Euphorinae) were collected in corn fields from Quebec, Canada (45°21'N; 73°09'W) and maintained in the laboratory for approximately two years, with regular introductions of wild individuals to maintain genetic variability. Coccinellids were reared on a liver-based artificial diet (Firlej *et al.*, 2006), grounded pollen, mediterranean flour moth's eggs (*Ephestia kuehniella* Keller) and aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris). Parasitoids were reared on *C. maculata* adults by placing, every two days, 30 *C. maculata* adults with four *D. coccinellae* adult females for 24 h. Parasitized *C. maculata* were incubated during three weeks to allow larval parasitoid development, and adults *D. coccinellae* emerging were kept in Petri dishes (5 cm diameter) with water and honey. Insects were reared at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ RH and under a LD 16:8 h photoperiod. Parasitoids used here were reared on *C. maculata* host as rearing on *H. axyridis* remains unsuccessful.

Both parasitoid and host behaviours were observed i) in interspecific paired-choice tests where a single *D. coccinellae* female was placed in contact with either three *C. maculata*

and three *H. axyridis* adult females or three *C. maculata* and three *H. axyridis* fourth instar larvae, and ii) in intraspecific paired-choice tests where a single *D. coccinellae* female was placed in contact with three *H. axyridis* adult females and three *H. axyridis* fourth instar larvae. The adults *C. maculata* and *H. axyridis* tested were one week old females with uniform body size (mean pronotum width \pm SE: 3.20 ± 0.25 mm for *H. axyridis* and 2.39 ± 0.09 mm for *C. maculata*) and the larvae tested for both host species were at the fourth instar with uniform body weight (mean body weight \pm SE: 18.06 ± 2.9 mg for *H. axyridis* and 11.63 ± 2.3 mg for *C. maculata*). Each choice test represented a treatment replicated 15 times, with new parasitoid females and hosts each time. At the time of the experiment, parasitoid females were two days old and previously experienced in a Petri dish (10.5 cm diameter) for 1 h with six hosts of the same type (species or stages) offered in the test. During the following hour, females were isolated with water and honey. Pre-tests demonstrated that parasitoids were able to lay 4.4 ± 2.8 eggs, 1 h after being experienced as described. Prior to each assay, hosts used in each treatment were marked with acrylic paint for visual recognition; preliminary observations showed that acrylic paint did not influence the parasitoid female's behaviour in her host choice.

The number and duration of behaviours displayed by parasitoid females (table 2.1) were recorded with the "Observer" software (version 4.0; Noldus, 1991). Defensive behaviours expressed by hosts against parasitoids (table 2.1) were also recorded but not timed. When encountering a host, *D. coccinellae* females examine it with antennae, bend the abdomen with the ovipositor directed toward the host and sting it. The female inserts her ovipositor inside the host abdomen in a rapid movement and either accepts the host and lays an egg or rejects it and remove her ovipositor without depositing an egg (Richerson & DeLoach, 1972; Orr *et al.*, 1992). Behaviour recording started when the parasitoid female was released in the Petri dish (10.5 cm diameter) and ended after 30 min. In all experiments, each parasitoid female interacted with at least one host type offered. Hosts stung were kept in rearing at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and 50-60% RH for five days (i.e. time needed to observe developing eggs inside host abdomen) and dissected thereafter to check for egg presence with a dissecting microscope. We therefore distinguished between a host attack by the female parasitoid, indicating that this host was accepted following visual and antennal examination,

and oviposition, reflecting the successful egg deposition and development in five-day incubation period. To evaluate the proportion of ovipositor insertions that were followed by egg deposition, a two-day-old *D. coccinellae* female was placed in the presence of one-week-old *C. maculata* or *H. axyridis* adult female and observed for 30 min. Each test was replicated 10 times with new parasitoid females and hosts each time. The number of stings performed by the parasitoid female in each host was recorded and hosts were dissected immediately in PBS to recover eggs laid inside each host with a stereomicroscope.

Within a treatment, we compared the observed proportion of encounters with each host type to expected proportions of 50:50 by Chi-square analysis ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981). For each treatment, the relative frequency of host behavioural defences was calculated as the proportion of encounters with a host type that resulted in a given behaviour. This parameter was compared within a treatment between host types (species or stages) with a Student t-test ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981). In the interspecific paired choice tests between adults, data were square root transformed to comply with the assumptions of normality and homoscedasticity. We calculated mean handling time by summing the time spent by the parasitoid manipulating one host type (antennal examination + ovipositor bending + ovipositor insertion) and dividing it by the sum of encounters with this host type. The parasitoid attack preference was calculated by dividing the number of encounters followed by ovipositor insertion in a host type by the number of encounters with this host type. Oviposition represented the number of eggs observed inside each host divided by the number of ovipositor insertions observed in those hosts. Because of the lack of independence between the parasitoid interactions in paired-choice tests (Mansfield & Mills, 2004), we paired data for the analysis. The mean handling time was compared within a treatment between host types (species or stages) with a Paired t-test ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981) whereas the attack preference and the oviposition were compared with a Wilcoxon signed rank test ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981). The proportions of each defensive behaviour types used were compared using a Chi-square test ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981). Finally, the proportion of ovipositor rejection was compared between *H. axyridis* and *C. maculata* adults with Chi-square analysis ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981). All statistical tests were performed with the JMPin software (SAS Institute Inc.) (Sall & Lehman, 1996).

Table 2.1: Description of parasitoid and host behaviours recorded.

Parasitoid behaviours	
Antennal examination	Contacting the host with antennae followed by examination with the antennae
Ovipositor bended	Abdomen placed between legs with the ovipositor directed toward the host
Ovipositor attack	Quick stinging of the host with the ovipositor, the ovipositor returning to horizontal position shortly after
Cleaning	Cleaning of the body with legs
Walk	Walking in the Petri dish
Stop	Without any movements
Host defensive behaviours	
Attack	Attack of the parasitoid female with mandibles
Escape	Running away
Leg movements	Scratching movement from the metathoracic legs to kick the parasitoid ovipositor

RESULTS

Interspecific host choice

Adults

The parasitoid encountered *H. axyridis* adults significantly more often than *C. maculata* adults ($\chi^2_1 = 53.55$, $p < 0.0001$) (fig. 2.1). Adults of *H. axyridis* expressed a higher relative frequency of behavioural defences in the presence of the parasitoid than did *C. maculata* ($t_{1,28} = -2.22$, $p = 0.0346$) (tabl. 2.2). The mean handling time was longer ($t_{1,14} = 4.02$, $p = 0.0013$) and the oviposition was lower ($z = 10.50$, $p = 0.0310$) for *H. axyridis* than *C. maculata* adults (tabl. 2.2). When assessed five days after oviposition; no eggs were found in *H. axyridis* adults. The attack preference did not differ between host species ($z = 28.00$, $p = 0.117$) (tabl. 2.2). The proportions of the different behavioural defence types used by *H. axyridis* and *C. maculata* adults against the parasitoid were similar ($\chi^2_2 = 5.69$, $p = 0.0581$) (fig. 2.2). On the total time spent interacting with hosts in interspecific situation, *D. coccinellae* females spent 75.4% of their time with *H. axyridis* and 24.6% with *C. maculata*. No differences were observed between *H. axyridis* and *C. maculata* adults in the proportion of host rejections following ovipositor insertion ($\chi^2_1 = 0.15$, $p = 0.6983$). In *C. maculata* and *H. axyridis* adults, respectively 28 % and 24% of the ovipositor insertion were followed by egg deposition.

Larvae

The proportions of encounters with larvae of the two host species did not differ from 50:50 ($\chi^2_1 = 0.33$, $p = 0.5608$) (fig. 2.1). When a female *D. coccinellae* was given the choice between larvae of *H. axyridis* and *C. maculata*, the relative frequency of host defences, the mean handling time, the attack preference and the oviposition did not differ (tabl. 2.2). However, *H. axyridis* larvae used different behavioural defences against the parasitoid compared to *C. maculata* larvae ($\chi^2_2 = 5.34$, $p = 0.0208$) (fig. 2.2): upon encountering the parasitoid, *H. axyridis* larvae performed a higher proportion of attacks with mandibles and fewer escapes than did *C. maculata* larvae. On the total time spent interacting with larval hosts, *D. coccinellae* females spent 45.4% of their time with *H. axyridis* and 54.5% with *C. maculata*.

Intraspecific host choice

We observed a higher proportion of encounters in favour of *H. axyridis* adults than larvae ($\chi^2_1 = 47.51$, $p < 0.0001$) (fig. 2.1). *Harmonia axyridis* adults displayed higher relative frequencies of behavioural defences in presence of the parasitoid than larvae ($t_{1, 28} = 3.85$, $p = 0.0006$) (tabl. 2.2). The mean handling time ($t_{1, 14} = 4.64$, $p = 0.0005$) and attack preference ($z = 35.50$, $p = 0.025$) were higher for *H. axyridis* adults. However, the oviposition was lower ($z = 22.50$, $p = 0.004$) in *H. axyridis* adults than in larvae (tabl. 2.2). The proportions of behavioural defences used by *H. axyridis* against the parasitoid differed between adults and larvae ($\chi^2_2 = 14.44$, $p = 0.0007$) (fig. 2.2). Larvae used more attacks to defend themselves against *D. coccinellae* than did adults. On the total time spent by *D. coccinellae* females interacting with *H. axyridis*, 79.7% was with adults and 20.3% with larvae.

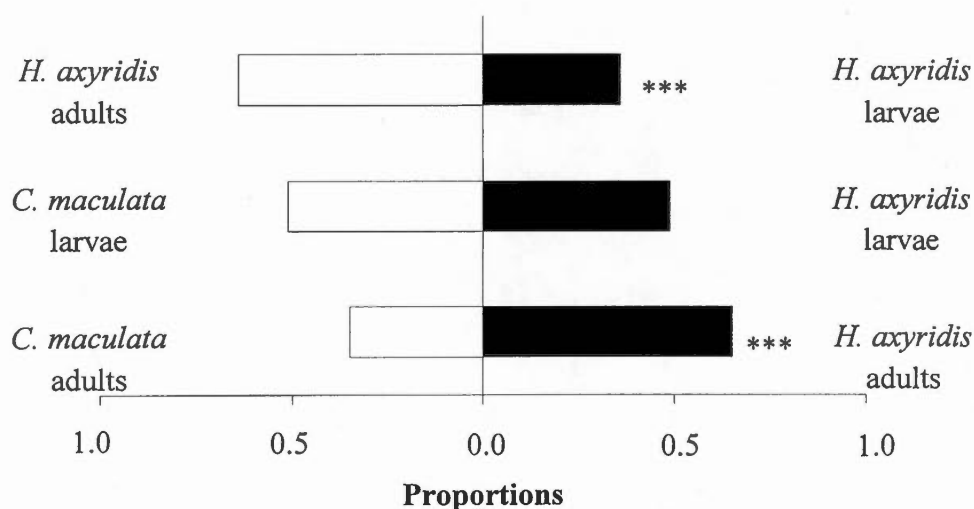


Figure 2.1: Proportion of host encounter by *D. coccinellae* in paired-choice tests (***: $p < 0.001$, Chi-square test).

Table 2.2: Comparison of host behavioural defences, handling time, attack preference and oviposition in paired-choice tests involving *H. axyridis* and *C. maculata* adults and 4th instar larvae as hosts and *D. coccinellae* as parasitoid.

	Interspecific host choice				Intraspecific host choice	
	Treatment 1		Treatment 2		Treatment 1	
	<i>H. axyridis</i> adults	<i>C. maculata</i> adults	<i>H. axyridis</i> larvae	<i>C. maculata</i> larvae	<i>H. axyridis</i> adults	<i>H. axyridis</i> larvae
Relative frequency of host behavioural defences [*]	0.23 ± 0.16 a	0.12 ± 0.15 b	0.10 ± 0.08 a	0.23 ± 0.26 a	0.22 ± 0.11 a	0.07 ± 0.09 b
Handling time (sec.) ^{**}	29.44 ± 14.43 a	16.40 ± 7.40 b	11.88 ± 3.35 a	11.27 ± 2.89 a	21.72 ± 9.54 a	10.53 ± 4.88 b
Attack preference ^{***}	0.25 ± 0.09 a	0.16 ± 0.20 a	0.41 ± 0.12 a	0.33 ± 0.19 a	0.35 ± 0.11 a	0.22 ± 0.19 b
Oviposition ^{***}	0.00 ± 0.00 b	0.33 ± 0.47 a	0.52 ± 0.30 a	0.45 ± 0.37 a	0.004 ± 0.018 b	0.35 ± 0.35 a

Within a treatment, different letters in the same row indicate significant differences with: ^{*} a Student t-test ($p < 0.05$); ^{**} a Paired t-test ($p < 0.05$) and

^{***} a Wilcoxon signed rank-test ($p < 0.05$).

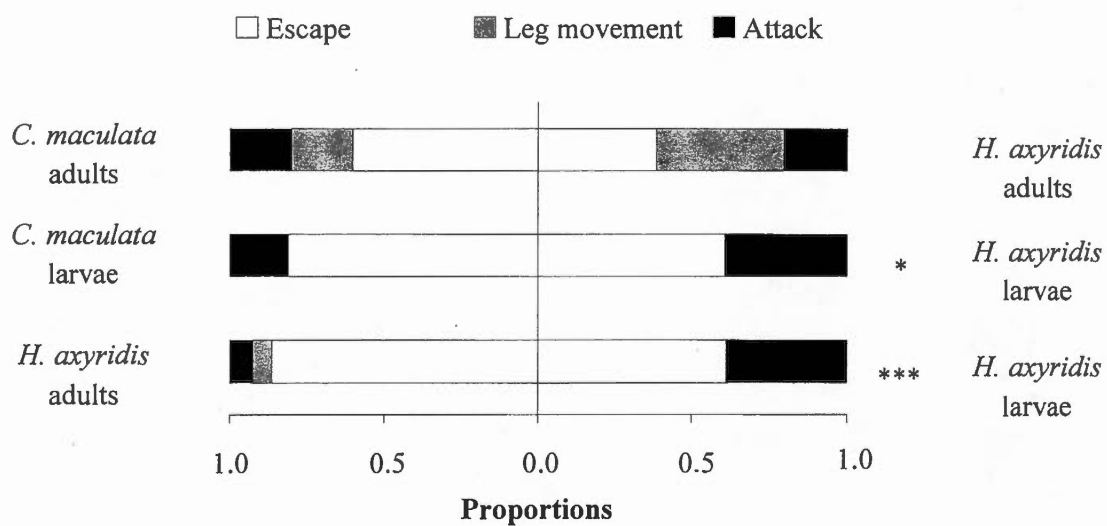


Figure 2.2: Proportion of behavioural defences expressed against the parasitoid in paired-choice tests (*: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$, Chi-square test).

DISCUSSION

The host recognition process in female parasitoids involves perception of host external cues such as contact kairomones, cuticle texture, host movement and shape (Vinson, 1976). The fact that *D. coccinellae* females encountered more often adults of the exotic host *H. axyridis* than other hosts (*C. maculata* adults or *H. axyridis* larvae) suggests that *H. axyridis* adults are either more attractive or more detectable for the parasitoid. Cues such as host body size and kairomones act as attractant for *D. coccinellae* (Richerson & DeLoach, 1972; Obrycki, 1989; Orr *et al.*, 1992; Al Abassi *et al.*, 2001), but host movement is an important factor (Richerson & DeLoach, 1972). Host mobility could explain our results if *H. axyridis* adults are more mobile than *C. maculata* adults or *H. axyridis* larvae.

The adults of *H. axyridis* showed a higher frequency of defensive behaviours than *C. maculata* adults or *H. axyridis* larvae, and frequently disrupted *D. coccinellae* ovipositional sequence, increasing the parasitoid handling time. This supports the notion that young stages are less defensive than adults against parasitoids (Gerling *et al.*, 1990; Mackauer *et al.*, 1996; Chau & Mackauer, 2000; Walker & Hoy, 2003) and that host defensive behaviours protect hosts mostly by increasing the parasitoid handling time (Gerling *et al.*, 1990; Gross, 1993; Potting *et al.*, 1999; Walker & Hoy, 2003). As predicted when host behavioural defences are effective (Gross, 1993), the parasitoid oviposition rate should be lower in the adults of the exotic host *H. axyridis* compared to other hosts. The oviposition measured (table 2) reflects the number of eggs laid during 30 min and supports the prediction of Gross (1993) that better defended hosts (i.e. *H. axyridis* adults) receive fewer eggs than hosts with weaker defences (i.e. *C. maculata* adults and *H. axyridis* larvae). However, the oviposition measured here is a combination of both host acceptance and host suitability. *Dinocampus coccinellae* is able to reject hosts on the basis of internal examination following ovipositor insertion (Sloggett *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006). Furthermore, following host acceptance and egg deposition, the egg can still be destroyed by the host immune system (Strand & Pech, 1995). Based on the number of eggs recovered immediately after oviposition, the proportion of host rejections did not differ between exotic and indigenous adult hosts (76% for *C. maculata* and 72% for *H. axyridis*). The fact that no parasitoid egg was recovered from adult *H. axyridis* 5 days after oviposition suggests that these eggs were destroyed by the host immune system. The action

of cellular components of the host immune system against *D. coccinellae* eggs was previously observed in *H. axyridis* adults (Firlej, personal observation) shortly after egg laying.

Female parasitoids are expected to prefer the most profitable hosts in terms of offspring production. Several ecological and physiological factors such as host quality, defensive behaviours, the presence of female competitors, previous experience and the physiological state of the parasitoid female (energy, time or egg-limitation) can influence the preference of females and result in a mismatch between host choice and offspring success (Collins & Dixon, 1986; Kouamé & Mackauer, 1991; Visser, 1995; Ueno, 1999; Rivero, 2000). These factors are however unlikely here as the females parasitoids used were standardized to minimize the effect of physiological factors and previous experience. Using *D. coccinellae* reared on *C. maculata* could have biased our results but we experimented parasitoid females previously observations with both host types provided to avoid a preference for *C. maculata*. Indeed, a higher preference of attack by the parasitoid for *C. maculata* was not observed in our results.

Considering the relative frequency of behavioural defences and the physiological unsuitability of *H. axyridis* adults, we should have observed a lower attack preference for *H. axyridis* adults than *C. maculata* adults or *H. axyridis* larvae. Contrary to this expectation, *H. axyridis* adults were attacked as much as *C. maculata* adults and more than *H. axyridis* larvae. Parasitoids judge host value using external host cues such as host size, colour, shape and movement (Vinson, 1976; Godfray, 1994). Based on those characteristics, generalist parasitoids can rank hosts (species and stages) on a scale of preference (Henry *et al.*, 2005). Host size is an important factor governing *D. coccinellae* host preference, and larger hosts are generally more suitable for immature development (Richerson & DeLoach, 1972; Obrycki, 1989; Orr *et al.*, 1992). Because *C. maculata* adults are smaller than *H. axyridis* adults (see materials and methods), adults *H. axyridis* could have been perceived by *D. coccinellae* as better quality hosts than *C. maculata* adults, explaining its higher attack preference for the former. In addition, *D. coccinellae* obtains a better fitness in adult rather than larval hosts and generally shows a preference for the former (Obrycki *et al.*, 1985; Geogheghan *et al.*, 1998).

Our results provide support for the “evolutionary trap” hypothesis applied to biological invasion (Schlaepfer *et al.*, 2005). This hypothesis predicts that indigenous species could be trapped by their evolutionary response when confronted to exotic species: the set of cues used to recognize a host does not provide an honest evaluation of the quality of the exotic host. Here, the parasitoid *D. coccinellae* was attracted toward *H. axyridis* adults and showed similar attack preference than toward the adults of the indigenous host *C. maculata* but its physiological unsuitability prevented the successful development of the eggs. Furthermore, the similar proportion of host rejection through ovipositor insertion between the exotic and the indigenous host suggests that *D. coccinellae* inaccurately assessed the internal quality of adults *H. axyridis*. Therefore, criteria used by *D. coccinellae*, such as the size and the stage, are no longer associated to success of parasitism in the case of interaction with adults of the exotic host *H. axyridis*. However, exotic hosts display efficient defensive behaviours, the importance of the evolutionary trap will tend to decrease because efficient defensive behaviours, which increase the parasitoid handling time, decrease the oviposition rate of the parasitoid.

As previously suggested, *H. axyridis* adults could represent an “egg sink” for *D. coccinellae* and could eventually impact its population levels (Hoogendoorn & Heimpel, 2002) in areas where *H. axyridis* and *C. maculata* share the habitat (Musser & Shelton, 2003; Hoogendoorn & Heimpel, 2004). Attacking adults of this species appear not an adaptive behaviour for *D. coccinellae* females, and our study suggests that attacking the larval stage of *H. axyridis* is a better choice. Contrary to what is observed with other host coccinellid species (Obrycki *et al.*, 1985; Geoghegan *et al.*, 1998), the larvae of *H. axyridis* are more suitable for *D. coccinellae* egg development than adults. This suggests that the *H. axyridis* adults found parasitized by *D. coccinellae* larvae in field samples (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Firlej *et al.*, 2005) probably originated from *D. coccinellae* attacks on *H. axyridis* larvae.

Host selection by female parasitoids is a trade-off between the cost of attacking a host, including its defensive behaviours, and the potential gain associated with host value. Here, both behavioural defences and physiological unsuitability represent barriers to parasitism in the adults of the exotic host *H. axyridis* and indicate that *D. coccinellae* gains

no fitness by attacking these adults. First, the behavioural defences expressed by the exotic host *H. axyridis* increased the parasitoid handling time. The behavioural defences expressed by *H. axyridis* adults have probably evolved as a result of pressures not exclusively associated to parasitism but providing advantageous protection against parasitoids (Gross, 1993). The effectiveness of *H. axyridis* behavioural defences has been previously measured only in competition with other coccinellid species (Yasuda *et al.*, 2001; Burgio *et al.*, 2002; Michaud, 2002; Snyder *et al.*, 2004; Yasuda *et al.*, 2004). Second, the physiological unsuitability of *H. axyridis* prevented the development of the parasitoid egg.

This study has demonstrated that host assessment by generalist parasitoids is not always perfect, especially when confronted to a new exotic host. Moreover, our data point to barriers to parasitism between an exotic host and an indigenous parasitoid 12 years after a biological invasion. The very short period of time given to coevolution to operate between *D. coccinellae* and *H. axyridis* in North America, due to the recent invasion of *H. axyridis*, probably accounts for this non-optimal host evaluation by *D. coccinellae*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Danielle Thibodeau, Josiane Vaillancourt, Julie Frenette, Mathilde Lheureux for technical help in insect rearing and experiments. This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to D. Coderre and a grant from Hydro-Québec to A. Firlej.

REFERENCES

- Al Abassi, S., Birkett, M.A., Pettersson, J., Pickett, J.A., Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. (2001) Response of the ladybird parasitoid *Dinocampus coccinellae* to toxic alkaloids from the seven-spot ladybird, *Coccinella septempunctata*. *Journal of Chemical Ecology*, **27**, 33-43.
- Aliabadi, B.W. & Juliano, S.A. (2002) Escape from gregarine parasites affects the competitive interactions of an invasive mosquito. *Biological Invasions*, **4**, 283-297.
- Allen, G. R. (1990) Influence of host behavior and host size on the success of oviposition of *Cotesia urabae* and *Dolichogenidea eucalypti* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behavior*, **3**, 733-750.
- Alphen, J.J.M. van & Vet, L.E.M. (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. Insect parasitoids. *Insect Parasitoids* (ed. by J.K. Waage and D.J. Greathead), pp. 26-61. 13th Symposium of the Royal Entomological Society of London. Academic Press. London.
- Braendle, C. & Weisser, W.W. (2001) Variation in escape behavior of red and green clones of the pea aphid. *Journal of Insect Behaviour*, **14**, 497-509.
- Burgio, G., Santi, F. & Maini, S. (2002) On intra-guild predation and cannibalism in *Harmonia axyridis* (Pallas) and *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control*, **24**, 110-116.
- Chapin, J.B. & Brou, V.A. (1991) *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **93**, 630-635.
- Chau, A. & Mackauer, M. (1997) Dropping of pea aphids from feeding site: Consequence of parasitism by the wasp, *Monoclonus paulensis*. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, **83**, 247-252.
- Chau, A. & Mackauer, M. (2000) Host-instar selection in the aphid parasitoid *Monoclonus paulensis* (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae): A preference for small pea aphids. *European Journal of Entomology*, **97**, 347-353.
- Chau, A. & Mackauer, M. (2001) Preference of the aphid parasitoid *Monoclonus paulensis* (Hymenoptera : Baconidae, Aphidiinae) for different aphid species. Female choice and offspring survival. *Biological Control*, **20**, 30-38.
- Collins, M.D. & Dixon, A.F.G. (1986) The effect of egg depletion on the foraging behaviour of an aphid parasitoid. *Journal of Applied Entomology*, **102**, 342-352.
- Colunga-Garcia, M. & Cage, S.H. (1998) Arrival, establishment, and habitat use of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) in a Michigan landscape. *Environmental Entomology*, **27**, 1574-1580.
- Cornell, J.C., Stamp, N.E. & Bowers, M.D. (1987) Developmental change in aggregation, defense and escape behaviour of buckmoth caterpillars, *Hemileuca lucina* (Saturniidae). *Behavioural Ecology and Sociobiology*, **20**, 383-388.
- Cottrell, T.E. & Shapiro-Ilan, D.I. (2003) Susceptibility of a native and an exotic lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **84**, 137-144.
- Davis, D., Stewart, S.L., Manica, A. & Majerus, M.E.N. (2006) Adaptive preferential selection of female coccinellid hosts by the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology*, **103**, 41-45.
- Dill, L.M., Fraser, A.H.G. & Roitberg, B.D. (1990) The economics of escape behaviour in the

- pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Oecologia*, **83**, 473-478.
- Farias, A.M.I. de & Hopper, K.R. (1999) Oviposition behavior of *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Aphididae) and defense behavior of their host *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, **28**, 858-862.
- Firlej, A., Boivin, G., Lucas, E. & Coderre, D. (2005) First report of parasitism of *Harmonia axyridis* parasitism by *Dinocampus coccinellae* Schrank in Canada. *Biological Invasions*, **7**, 553-556.
- Firlej, A., Chouinard, G. & Coderre, D. (2006) Selection and optimization of a meridic diet for the rearing of *Hyaliodes vitripennis* Say (Hemiptera: Miridae), a predatory of mites in apple orchard. *Biocontrol Science and Technology*, **16**, 743-751.
- Gentry, G.L. & Dyer, L.A. (2002) On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology*, **83**, 3108-3119.
- Geoghegan, I.E., Majerus, T.M.O. & Majerus, M.E.N. (1998) Differential parasitisation of adult and pre-imaginal *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) by *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology*, **95**, 571-579.
- Gerling, D., Roitberg, B.D. & Mackauer, M. (1990) Instar-specific defense of the pea-aphid, *Acyrtosiphon pisum*: influence on oviposition success of the parasite *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Insect Behaviour*, **3**, 501-514.
- Godfray, H.C.J. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Gordon, R.D. (1985) The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. *Journal of New York Entomological Society*, **93**, 1-912.
- Gross, P. (1993) Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **38**, 251-273.
- Henry, L.M., Gillespie, D.R. & Roitberg, B.D. (2005) Does mother really know best? Oviposition preference reduces reproductive performance in the generalist parasitoid *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, **116**, 167-174.
- Hodek, I. & Honěk, A. (1996) *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. (2002) Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. *Biological Control*, **25**, 224-230.
- Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. (2004) Competitive interactions between an exotic and a native ladybeetle: a field cage study. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, **111**, 19-28.
- Keane, R.M. & Crawley, M.J. (2002). Exotic plants invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 164-171.
- Koch, R.L. (2003) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, **3**, 1-16.
- Kouamé, K.L. & Mackauer, M. (1991) Influence of aphid size, age and behaviour on host choice by the parasitoid wasp *Ephedrus californicus*: A test of host-size models. *Oecologia*, **88**, 197-203.

- Krakau, M., Thielges, D.W. & Reise, K. (2006) Native parasites adopt introduced bivalves of the North Sea. *Biological Invasions*, **8**, 919-925.
- LaMana, M.L. & Miller, J.C. (1996) Field observations on *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in Oregon. *Biological Control*, **6**, 232-237.
- Lederhouse, R.C. (1990) Avoiding the hunt: primary defenses of Lepidopteran caterpillars. *Insect Defenses: Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators* (ed. By D.L. Evans and J.O. Schmidt), pp. 175-189. State University of New York Press. New York.
- Losey, J.E. & Denno, R.F. (1998) The escape response of the pea aphids to foliar-foraging predators: factor affecting dropping behaviour. *Ecological Entomology*, **23**, 53-61.
- Mackauer, M., Michaud, J.P. & Völkl, W. (1996) Host choice by aphidiid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): host recognition, host quality, and host value. *The Canadian Entomologist*, **128**, 959-980.
- Mangel, M. (1989) Evolution of host selection in parasitoids: Does the state of the parasitoid matter? *The American Naturalist*, **133**, 688-705.
- Mansfield, S. & Mills, N.J. (2004) A comparison of methodologies for the assessment of host preference of the gregarious egg parasitoid *Trichogramma platneri*. *Biological Control*, **29**, 332-340.
- Michaud, J.P. (2002) Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. *Environmental Entomology*, **31**, 827-835.
- Musser, F.R. & Shelton, A.M. (2003) Factors altering the temporal and within-plant distribution of coccinellids in corn and their impact on potential intra-guild predation. *Environmental Entomology*, **32**, 575-583.
- Nalepa, C.A. & Kidd, K.A. (2002) Parasitism of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) by *Strongygaster triangulifera* (Diptera: Tachinidae) in North Carolina. *Journal of Entomological Science*, **37**, 124-127.
- Obrycki, J.J. (1989) Parasitization of native and exotic coccinellids by *Dinocampus coccinellae* (Schränk) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, **62**, 211-218.
- Obrycki, J.J., Tauber, M.J. & Tauber, C.A. (1985) *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae): parasitization and development in relation to host-stage attacked. *Annals of the Entomological Society of America*, **78**, 852-854.
- Orr, C.J., Obrycki, J.J. & Flanders, R.V. (1992) Host-acceptance behavior of *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **85**, 722-730.
- Payne, C.M., Tillberg, C.V. & Suarez, A.V. (2004) Recognition systems and biological invasions. *Annales Zoologici Fennici*, **41**, 843-858.
- Potting, R.P.J., Vermeulen, N.E. & Conlong, D.E. (1999) Active defence of herbivorous hosts against parasitism: adult parasitoid mortality risk involved in attacking a concealed stem-boring host. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, **91**, 143-148.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J.T.A. & Dunn, A.M. (2004) Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 385-390.
- Richerson, J.V. & DeLoach, C.J. (1972) Some aspects of host selection by *Perilitus coccinellae*. *Annals of the Entomological Society of America*, **65**, 834-839.

- Rivero, A. (2000) The relationship between host selection behaviour and offspring fitness in a koinobiont parasitoid. *Ecological Entomology*, **25**, 467-472.
- Sall, J. & Lehman, A. (1996) *JMP Start Statistics: A Guide to Statistical and Data Analysis using JMP® and JMP IN® Software*. Duxbury Press, Toronto.
- Sato, S., Yasuda, H. & Evans, E.W. (2005) Dropping behaviour of larvae of aphidophagous ladybirds and its effects on incidence of intraguild predation: interactions between the intraguild prey, *Adalia bipunctata* (L.) and *Coccinella septempunctata* (L.) and the intraguild predator, *Harmonia axyridis* Pallas. *Ecological Entomology*, **30**, 220-224.
- Schlaepfer, M.A., Sherman, P.W., Blossey, B. & Runge, M.C. (2005). Introduced species as evolutionary traps. *Ecology Letters*, **8**, 241-246.
- Shapiro-Ilan, D.I. & Cottrell, T.E. (2005) Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, **89**, 150-156.
- Singer, M.S. & Stireman, J.O. (2003) Does anti-parasitoid defense explain host-plant selection by a polyphagous caterpillar? *Oikos*, **100**, 554-562.
- Sloggett, J.J., Webberley, K.M. & Majerus, M.E.N. (2004) Low parasitoid success on a myrmecophilous host is maintained in the absence of ants. *Ecological Entomology*, **29**, 123-127.
- Snyder, W.E., Clevenger, G.M. & Eigenbrode, S.D. (2004) Intraguild predation and successful invasion by introduced ladybird beetles. *Oecologia*, **140**, 559-565.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1981) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman & company, New York.
- Strand, M.R. & Pech, L.L. (1995) Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationship. *Annual Review of Entomology*, **40**, 31-56.
- Tedders, W.L. & Schaefer, P.W. (1994) Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the southern United States. *Entomological News*, **105**, 228-243.
- Toepfer, S. & Kuhlmann, U. (2004) Survey for natural enemies of the invasive alien chrysomelid, *Diabrotica virgifera virgifera*, in Central Europe. *Biocontrol*, **49**, 385-395.
- Torchin, M.E. & Mitchell, C.E. (2004) Parasites, pathogens and invasions by plants and animals. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **2**, 183-190.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D. & Kuris, A.M. (2002) Parasites and marine invasions. *Parasitology*, **124**, S137-S151.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., McKenzie, V.J. & Kuris, A.M. (2003) Introduced species and their missing parasites. *Nature*, **421**, 628-630.
- Ueno, T. (1999) Host-feeding and acceptance by a parasitic wasp (Hymenoptera: Ichneumonidae) as influenced by egg load and experience in a patch. *Evolutionary Ecology*, **13**, 33-44.
- Vinson, S. B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **21**, 109-133.
- Visser, M.E. (1995) The effect of competition on oviposition decisions of *Leptopilina heteronoma* (Hymenoptera: Eucoilidae). *Animal Behaviour*, **49**, 1677-1687.
- Völkl, W. & Stadler, B. (1996) Colony orientation and successful defence behaviour in the conifer aphid, *Schizolachnus pineti*. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, **78**, 197-200.
- Walker, A.M. & Hoy, M.A. (2003) Responses of *Lipoplexis oregmae* (Hymenoptera:

- Aphidiidae) to different instars of *Toxoptera citricida* (homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 1685-1692.
- Yasuda, H., Evans, E.W., Kajita, Y., Urakawa, K. & Takizama, T. (2004) Asymmetric larval interactions between introduced and indigenous ladybirds in North-America. *Oecologia*, **141**, 722-731.
- Yasuda, H., Kikuchi, T., Kindlmann, P. & Sato, S. (2001) Relationships between attack and escape rates cannibalism, and intraguild predation in larvae of two predatory ladybirds. *Journal of Insect Behaviour*, **14**, 373-383.

Le chapitre 2 a démontré que les comportements défensifs des adultes de *H. axyridis* étaient plus importants que ceux des adultes de *C. maculata* ou des larves de *H. axyridis*. Ces comportements plus fréquents avaient pour effet de prolonger significativement le temps de manipulation du parasitoïde. Cependant, même si les comportements de défense de *H. axyridis* sont efficaces, cela ne peut expliquer complètement le faible parasitisme par *D. coccinellae* observé en nature. Parmi la séquence de succès de parasitisme d'un parasitoïde dans un hôte, la qualité de l'hôte joue un rôle important. Dans le chapitre 3, nous comparons l'adéquation de l'hôte exotique *H. axyridis* à celle de l'hôte indigène *C. maculata* pour le parasitoïde. Plus précisément, nous avons étudié le patron de croissance des cellules trophiques appelées tératocytes, lesquelles semblent jouer un rôle important dans les interactions physiologiques entre *D. coccinellae* et ses hôtes.

CHAPITRE 3

Teratocyte growth pattern reflects host suitability in a host-parasitoid assemblage

Annabelle Firlej, Eric Lucas, Daniel Coderre & Guy Boivin

Physiological Entomology (sous presse)

RÉSUMÉ

Chez certaines espèces de parasitoïdes, la membrane sérosale se scinde à l'éclosion et produit des cellules tératocytes qui assurent différentes fonctions (immunodéficience, sécrétion et nutrition) importantes dans les relations hôtes-parasitoïdes. Nous avons posé l'hypothèse que le patron de croissance des tératocytes pourrait refléter l'adéquation d'un hôte pour un parasitoïde. Nous avons étudié le patron de croissance des tératocytes (évolution de la taille et du nombre de tératocytes en fonction du temps) et utilisé des mesures directes de valeur adaptative pour comparer le développement de l'endoparasitoïde *Dinocampus coccinellae* dans un hôte marginal, la coccinelle *Harmonia axyridis*, et dans un hôte adéquat, la coccinelle *Coleomegilla maculata*. Les mesures indirectes de valeur adaptative prises pour les deux espèces hôtes confirment que *C. maculata* est un hôte adéquat pour *D. coccinellae*, contrairement à l'hôte marginal *H. axyridis*. Selon les analyses de régression, le nombre de tératocytes diminue linéairement alors que la taille des tératocytes augmente linéairement avec le temps dans l'hôte adéquat *C. maculata* (larves ou adultes). Dans l'hôte marginal, le parasitisme est observé seulement dans le stade larvaire où nous observons un délai dans le développement larvaire du parasitoïde. L'évolution de la taille des tératocytes est aussi très variable. Le patron de croissance des tératocytes du parasitoïde dans l'hôte marginal ne suit pas le modèle linéaire mis en évidence dans l'hôte adéquat. Le patron de croissance des tératocytes pourrait être un critère utile pour évaluer l'adéquation des hôtes et le spectre d'hôtes des parasitoïdes.

MOTS-CLEFS : Adéquation de l'hôte, Hôte marginal, Nutrition du parasitoïde, Hôte adéquat, Tératocytes.

ABSTRACT

In some parasitoid species, the serosa membrane breaks apart at hatching and produces teratocyte cells that assume various functions (immunossuppression, secretion and nutrition) mediating host-parasitoid relationships. Teratocyte growth patterns may thus reflect the host suitability for a parasitoid. The teratocyte growth pattern (increase in size and number of teratocytes as a function of time) is used to compare the development of the endoparasitoid *Dinocampus coccinellae* in a marginal host, the coccinellid *Harmonia axyridis*, and in a suitable host, *Coleomegilla maculata*. Indirect measures of fitness recorded in both host species confirm that *C. maculata* is a suitable host for *D. coccinellae* contrary to the marginal host *H. axyridis*. According to regression analysis, teratocyte numbers decrease linearly while teratocyte size increases linearly with time in the suitable host *C. maculata* (larvae or adults). In the marginal host, parasitism occurs only in the larval stage where a delay in the parasitoid larval development is observed. Evolution of teratocyte size was also highly variable. The teratocyte growth pattern of the parasitoid in the marginal host does not follow the linear model found in the suitable host. Teratocyte growth pattern may be a useful criterion to evaluate host-suitability and host range of parasitoids.

KEY-WORDS: Host suitability, Marginal host, Parasitoid nutrition, Suitable host, Teratocytes.

INTRODUCTION

For endoparasitoids, host characteristics directly influence the mother's fitness through offspring development. Females thus choose hosts most likely to allow larval development and to optimize their fitness gain depending on internal and external parameters (van Alphen & Vet, 1986; Godfray, 1994). Nevertheless, parasitoid females can oviposit in marginal or unsuitable hosts in field and laboratory conditions (Heimpel *et al.*, 2003). In a suitable host, all or nearly all parasitoid immatures develop into adults whereas in a marginal hosts only a small proportion develop and no parasitoid can develop in an unsuitable host. Host suitability thus depends on factors such as the host immune system, host toxins or the host nutritional quality which are often difficult to quantify (Vinson & Iwantsch, 1980; Strand & Pech, 1995; Lavine & Strand, 2002).

Teratocyte growth pattern could be a physiological factor reflecting host suitability while being relatively easy to quantify. When the egg hatches, the serosa membrane surrounding the embryo releases numerous spherical cells (i.e. teratocytes) in the haemolymph, with numbers ranging from 10 to 900 depending of the species (Dahlman, 1990). Teratocytes mediate host-parasitoid relationships through immunosuppression, secretion or nutrition (Dahlman, 1990; Vinson, 1990; Pennacchio *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Hotta *et al.*, 2001; Nakamatsu *et al.*, 2002; Rana *et al.*, 2002). In general, teratocytes absorb host nutrients and produce proteins that are either stored inside the cells or released into the host haemolymph (Sluss & Leutenegger, 1968; Okuda & Kadono-Okuda, 1995; Nakamatsu *et al.*, 2002). Teratocyte diameter increases with time and their number decreases progressively when the parasitoid larva ingests them (Sluss & Leutenegger, 1968; Pennacchio *et al.*, 1994; Kadono-Okuda *et al.*, 1995; De Buron & Beckage, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Alleyne *et al.*, 2001; Barratt & Sutherland, 2001; Hotta *et al.*, 2001).

Disrupted teratocyte growth pattern, either in the size and/or the number of teratocytes, has been observed in some host-parasitoid assemblages (Alleyne *et al.*, 2001; Barratt & Sutherland, 2001) or when parasitoid larvae develop in low quality artificial media (Strand *et al.*, 1985). Low success of parasitism has been associated with a lower number of teratocytes during the first days of parasitoid larval development (Alleyne *et al.*, 2001;

Barratt & Sutherland, 2001). It is hypothesized here that teratocyte growth patterns reflect host suitability for a parasitoid and that the number of teratocytes will be lower in a marginal compared with a suitable host. To test this hypothesis, the braconid parasitoid *Dinocampus coccinellae* Schrank (Hymenoptera: Braconidae) and two hosts were used - the suitable host *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae) and the marginal host *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). The total and successful parasitism were evaluated on each host, along with the developmental time, adult size and egg load as indirect measures of parasitoid fitness. Teratocyte growth pattern (size and number of teratocytes) was also evaluated in both host species.

Dinocampus coccinellae is a solitary endoparasitoid of coccinellids and displays a cosmopolitan distribution (Hodek & Honěk, 1996). Females lay eggs inside coccinellid adults or larvae; the wasp larvae develop in the host haemolymph and emerge from the coccinellid adult to spin a cocoon between its legs (Balduf, 1926; Hodek & Honěk, 1996). *Dinocampus coccinellae* produces only females by thelytokous parthenogenesis (Balduf, 1926). Each parasitoid egg produces an average of 550 teratocytes that gradually increase in size as they accumulate nutrients from host haemolymph during development of the immature parasitoid. The parasitoid larva feeds directly on these teratocytes, gradually reducing their number (Sluss & Leutenegger, 1968; Kadono-Okuda *et al.*, 1995). The role of *D. coccinellae* teratocytes appears to be mainly nutritive (Sluss & Leutenegger, 1968; Kadono-Okuda *et al.*, 1998; Gopalapillai *et al.*, 2005).

The marginal host *H. axyridis* is an exotic coccinellid repeatedly introduced from Japan and the ex-USSR into the United States throughout the 20th century (Gordon, 1985; Tedders & Schaefer, 1994); it became established in Canada in 1994 (Coderre *et al.*, 1995). In North America, *H. axyridis* has a similar ecology and shares habitats and food resource with *C. maculata*, a suitable host for *D. coccinellae* (LaMana & Miller, 1996; Musser & Shelton, 2003). Laboratory experiments showed that *D. coccinellae* attacks *H. axyridis* adults (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Firlej, unpublished data) but field and laboratory work showed low levels of successful parasitism of *H. axyridis* adults by *D. coccinellae* in North America (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Firlej *et al.*, 2005). Even if *H. axyridis* is

sympatric with *D. coccinellae* in Asia (Maeta, 1969), the degree of coevolution between *H. axyridis* and *D. coccinellae* remains unknown, as the geographical origin of the parasitoid has not been clearly determined (America or Europe) (Balduf, 1926).

MATERIALS AND METHODS

Insects

In summer 2002, the two hosts *C. maculata* and *H. axyridis*, and the parasitoid *D. coccinellae* were collected from corn fields (*Zea mays*) in Quebec, Canada (45°21' 29"N; 73°09' 08"W). The two coccinellids were reared on a meat-based artificial diet (Firlej *et al.*, 2006) with ground pollen and live aphids (*Acyrtosiphon pisum* (Harris)). Field-collected adults were regularly added to the culture to maintain genetic variability. The strain of *D. coccinellae* used originated from parasitized adults of *C. maculata*. Parasitoid adults were supplied with water and honey and reared on *C. maculata* adults: twice a week, 20 *C. maculata* adults were supplied to four *D. coccinellae* adults for parasitization and removed after 24 h. Thereafter, parasitized *C. maculata* adults were maintained in rearing boxes (Ziploc®, 946 ml) until the parasitoid pupation. All insects were held in growth chambers at 20 ± 2 °C with 60% relative humidity (RH) and under a LD 16:8 h photoperiod.

Indirect measures of *Dinocampus coccinellae* fitness in two hosts.

Various biological parameters were measured on *D. coccinellae* that were reared in the two host species (*C. maculata* and *H. axyridis*) parasitized at two different stages (4th instar and adult). Fourth instars and adults of coccinellids are both suitable stages for development of *D. coccinellae* (Obrycki *et al.*, 1985). A single *D. coccinellae* female, one-week old, was placed in a Petri dish (diameter = 5 cm; height = 1 cm) where either one *H. axyridis* or one *C. maculata* host was offered until an insertion of the ovipositor was observed. Only one insertion of the ovipositor was allowed per host. All presumed parasitized hosts were kept individually in a Petri dish (diameter = 5 cm; height = 1 cm) with artificial diet, aphids (*A. pisum*) and lepidopteran eggs (*Ephestia kuehniella* Keller). The food was changed every three days and aphids every day until emergence of parasitoid adults. Attacked hosts from which no parasitoid emerged were dissected after 30 days to assess presence of *D. coccinellae* eggs or larvae. Under these experimental conditions, development of *D.*

coccinellae takes an average of 21 days (Wright & Laing, 1978). The experiment was carried out at 24 ± 2 °C, 60% RH and LD 16:8 h.

Dinocampus coccinellae egg-larval development time was calculated as the time between oviposition and emergence of a pupa from the host. The time between the emergence of the pupa and the emergence of *D. coccinellae* adult represented the pupal developmental time. Left hind tibia length and egg load (only mature eggs were counted) at emergence were measured on *D. coccinellae* adults. Success of parasitism by *D. coccinellae* was calculated as the percentage of *D. coccinellae* adults produced from the total number of hosts attacked. Total parasitism by *D. coccinellae* was calculated as the number of hosts from which *D. coccinellae* successfully emerged, plus the number of hosts where eggs or dead larvae were found at dissection on the total number of hosts attacked.

Egg-larval developmental time and tibia length of *D. coccinellae* females were compared between hosts and stages using a one-way ANOVA followed by a *post hoc* comparison with a Tukey-Kramer test when needed (Sokal & Rohlf, 1981). Because assumptions of residual normality and equality of variances were not met even after data transformation, pupal and total developmental time and egg-load of *D. coccinellae* females were compared between hosts and stages using a non-parametric Kruskal-Wallis test. When post-hoc comparisons were required, Wilcoxon non-parametric tests were used with error rates corrected at $\alpha = 0.0169$ according to Scherrer (1984). Total and successful parasitism were compared between hosts and stages with G test (Sokal & Rohlf, 1981) and error rates were corrected at $\alpha = 0.0169$ in *post hoc* comparisons according to Scherrer (1984). Analyses were carried out using the software JMPin® (SAS institute Inc., Cary, NC).

Teratocyte growth pattern

To assess teratocyte growth pattern (size and number), one adult (7-day-old) or one 4th instar of each host species was offered for parasitization to a *D. coccinellae* female (2–12-day-old) as described above. Starting five days after parasitization, corresponding to the time of egg hatch (Obrycki *et al.*, 1985), 3–6 adults of each host species were dissected daily. At this time, hosts parasitized during 4th instar had moulted into adults. The *D. coccinellae*

larvae were measured from the tip of the head to the end of the abdomen using a microscope (magnification: x 200) or stereomicroscope (magnification: x 32 to x 50) depending on their size. The 3rd and 4th instars of the parasitoid could not be distinguished. Teratocyte numbers were assessed by washing a host with saline solution and pipetting the whole haemolymph on a slide where the number of teratocytes was counted under a stereomicroscope (magnification: x 8 to x 32). The diameter of 30 randomly selected teratocytes was measured with the help of a microscope (magnification: x 200 to x 600) connected to the image analysis software Image Pro[®] (Media Cybernetics Inc., Sylver Spring, MD).

Linear regression analysis was used to study the relationship between *D. coccinellae* larval growth and the time post-parasitization (PROC REG procedure) for each host species and stage parasitized (Sokal & Rohlf, 1981). Kadono-Okuda *et al.* (1995) observed that in *C. septempunctata* adults, the *D. coccinellae* teratocytes numbers decreased linearly and teratocyte diameter increased linearly with time after parasitization. Therefore, linear regression analysis was used to study the relationship between the diameter and number of teratocytes and time post-parasitization (PROC REG procedure). Slopes and intercepts of each regression curve were compared using a PROC REG procedure. Analyses were carried out using the software SAS[®] (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTS AND DISCUSSION

Assessments of *Dinocampus coccinellae* fitness in two hosts.

No pupae of *D. coccinellae* formed and no eggs or larvae were found after dissection when *H. axyridis* adults were used as hosts. The variables measured for *Dinocampus coccinellae* (tabl. 3.1) were therefore statistically compared only between *C. maculata* larvae and adults and between *C. maculata* larvae and *H. axyridis* larvae. Total and successful parasitism by *D. coccinellae* were significantly influenced by the type of host offered ($G = 12.22$; d.f. = 2; $P = 0.002$ and $G = 21.48$; d.f. = 2; $P < 0.001$, respectively). No differences in total and successful parasitism rates between larvae and adults of *C. maculata* parasitized by *D. coccinellae* were observed (total parasitism: $G = 0.11$; d.f. = 1; $P = 0.738$; successful parasitism: $G = 0.69$; d.f. = 1; $P = 0.407$). *Harmonia axyridis* larvae were significantly less parasitized by *D. coccinellae* and adult emergence was lower than in *C. maculata* larvae

(total parasitism: $G = 7.95$; d.f. = 1; $P = 0.005$; successful parasitism: $G = 19.17$; d.f. = 1; $P < 0.001$). The egg-larval and the total development time of *D. coccinellae* were longer in *H. axyridis* larvae than in *C. maculata* larvae (egg-larval: $P < 0.05$; total: $Z = 3.07$; d.f. = 1; $P = 0.002$) or *C. maculata* adults (egg-larval: $P < 0.05$; total: $Z = 3.13$; d.f. = 1; $P = 0.002$). *Dinocampus coccinellae* spent more time in the pupal stage when issued from *H. axyridis* larvae and *C. maculata* adults than from *C. maculata* larvae ($Z = 2.77$; d.f. = 1; $P = 0.006$; $Z = 3.75$; d.f. = 1; $P = 0.002$). *Dinocampus coccinellae* offspring parameters (tibia length and egg load) did not differ significantly with the host offered (tibia length: $F = 2.15$; d.f. = 2; $P = 0.129$; egg load: $\chi^2 = 4.61$; d.f. = 1; $P = 0.01$).

Lower successful parasitism and delay in developmental time are observed in marginal hosts compared with suitable ones. The important difference between the total and successful parasitism in *H. axyridis* is due to the *D. coccinellae* larval mortality (43%). As *D. coccinellae* teratocytes have a nutritive role (Sluss & Leutenegger, 1968; Kadono-Okuda *et al.*, 1998; Gopalapillai *et al.*, 2005), their absence or low number in *H. axyridis* (see below) may result in insufficient food for the parasitoid larval growth and could explain both the lower successful parasitism and the developmental delay. A similar observation was made with *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing a clone of the aphid *A. pisum* (Li *et al.*, 2002) where the absence of successful parasitoid development was associated with a complete absence of teratocytes in the host haemolymph. Despite the observation of females *D. coccinellae* attacking *H. axyridis* adults, no parasitoid developed in these adults. Neither eggs nor larvae of *D. coccinellae* were found in *H. axyridis* adults even one month after a contact, confirming previous observations by Hoogendoorn & Heimpel (2002).

Table 3.1: *Dinocampus coccinellae* biological parameters after parasitization of 4th instar larvae and adults of *C. maculata* and *H. axyridis*.

	Host species and stage parasitized			
	<i>C. maculata</i>		<i>H. axyridis</i>	
	4 th instar	Adult	4 th instar	Adult
Total parasitism (%)*	58.3 a	62.2 a	28.6 b	0
Successful parasitism (%)*	58.3 a	48.6 a	12.2 b	0
Developmental time (days \pm SE)				
Egg-larval**	17.2 \pm 1.3 b	15.4 \pm 0.9 c	19.7 \pm 2.2 a	-
Pupal ***	7.1 \pm 0.6 b	7.9 \pm 0.5 a	8.2 \pm 0.5 a	-
Total***	24.3 \pm 1.2 b	23.4 \pm 0.8 b	28.0 \pm 2.0 a	-
<i>D. coccinellae</i> tibia length (mm \pm SE)**	1.26 \pm 0.05 a	1.29 \pm 0.07 a	1.32 \pm 0.07 a	-
<i>D. coccinellae</i> egg load (nb \pm SE)***	154 \pm 34 a	184 \pm 41 a	158 \pm 37 a	-

Means followed by different letters in same rows differed significantly at $\alpha = 0.05$ with a *: Chi-square test, a **: Tukey-Kramer and differed significantly at $\alpha = 0.017$ with a ***: Wilcoxon test.

Teratocyte growth pattern

Dinocampus coccinellae larval size increased linearly with time post-parasitization irrespective of whether *C. maculata* adult or larvae or *H. axyridis* larvae were used as hosts (tabl. 3.2; fig. 3.1). R-squares were lower when *D. coccinellae* larvae were in *C. maculata* adults and *H. axyridis* larvae than in *C. maculata* larvae (tabl. 3.2). Slopes and intercepts were not significantly different between regression lines ($P > 0.05$). Diameter of teratocytes increased linearly with time in *C. maculata* larvae and adults and in *H. axyridis* larvae (tabl. 3.2; fig. 3.2) but R-square was lower in the latter (tabl. 3.2). Slopes and intercepts were not significantly different between lines ($P > 0.05$). At egg hatch, an average of 514 teratocytes were found in *C. maculata* when parasitized in the adult stage, 432 teratocytes when parasitized in the larval stage and 177 teratocytes in *H. axyridis* when parasitized in the larval stage. Teratocyte numbers decreased linearly with time in both *C. maculata* adults and larvae (tabl. 3.2; fig. 3.3). Slopes and intercepts did not differ significantly ($P > 0.05$). Teratocyte numbers did not evolve linearly as a function of time post-parasitization in *H. axyridis* larvae (tabl. 3.2; fig. 3.3).

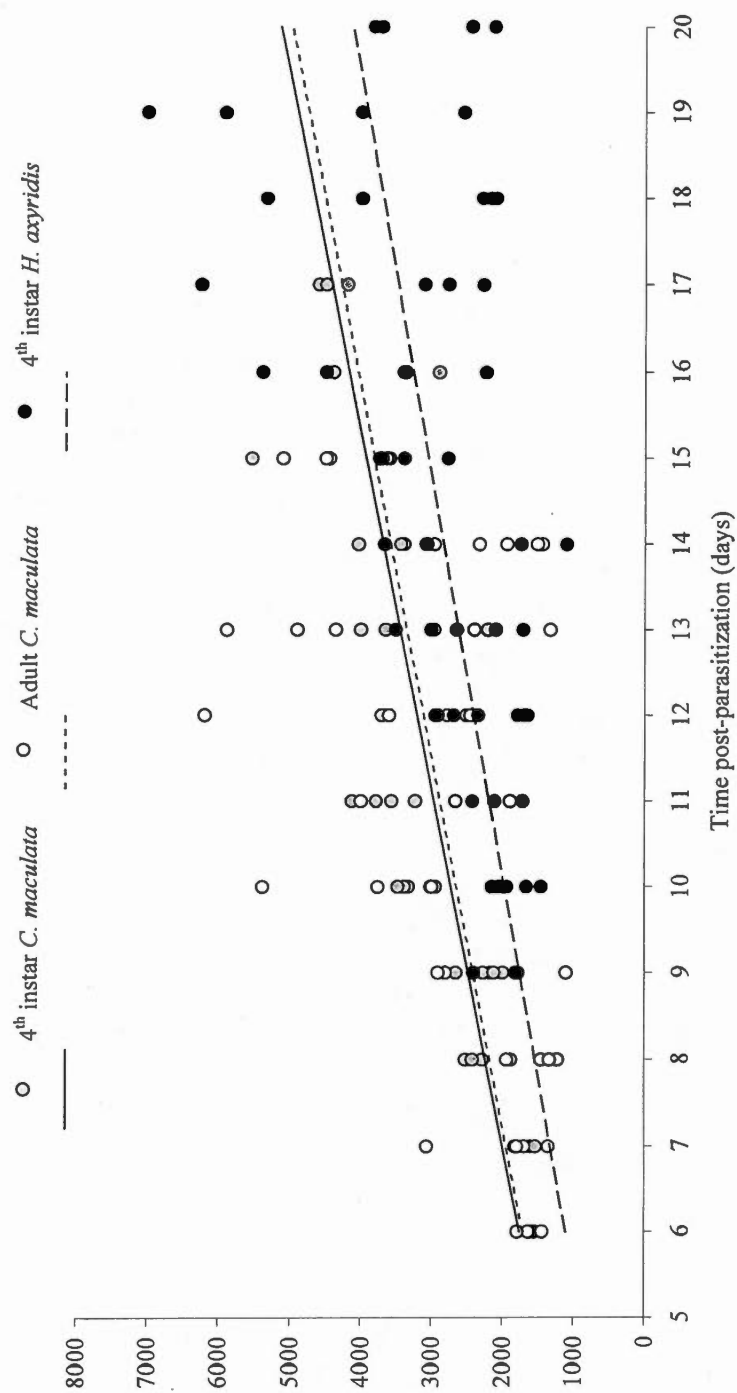


Figure 3.1: *Dinocampus coccinellae* larval size (μm) in suitable host *Coleomegilla maculata* and marginal host *Harmonia axyridis* as a function of time post-parasitization (days).

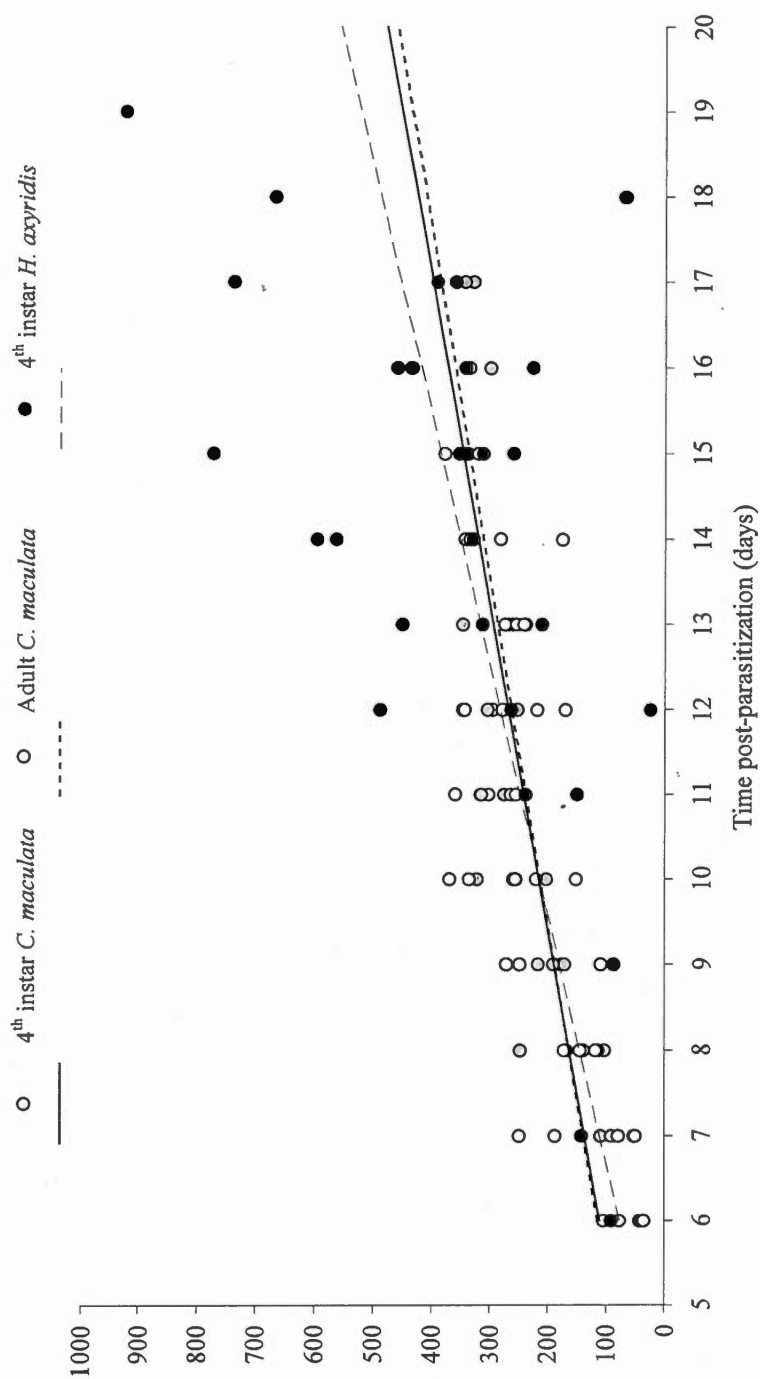


Figure 3.2: *Dinocampus coccinellae* teratocyte diameter (μm) in suitable host *Coleomegilla maculata* and marginal host *Harmonia axyridis* as a function of time post-parasitization (days).

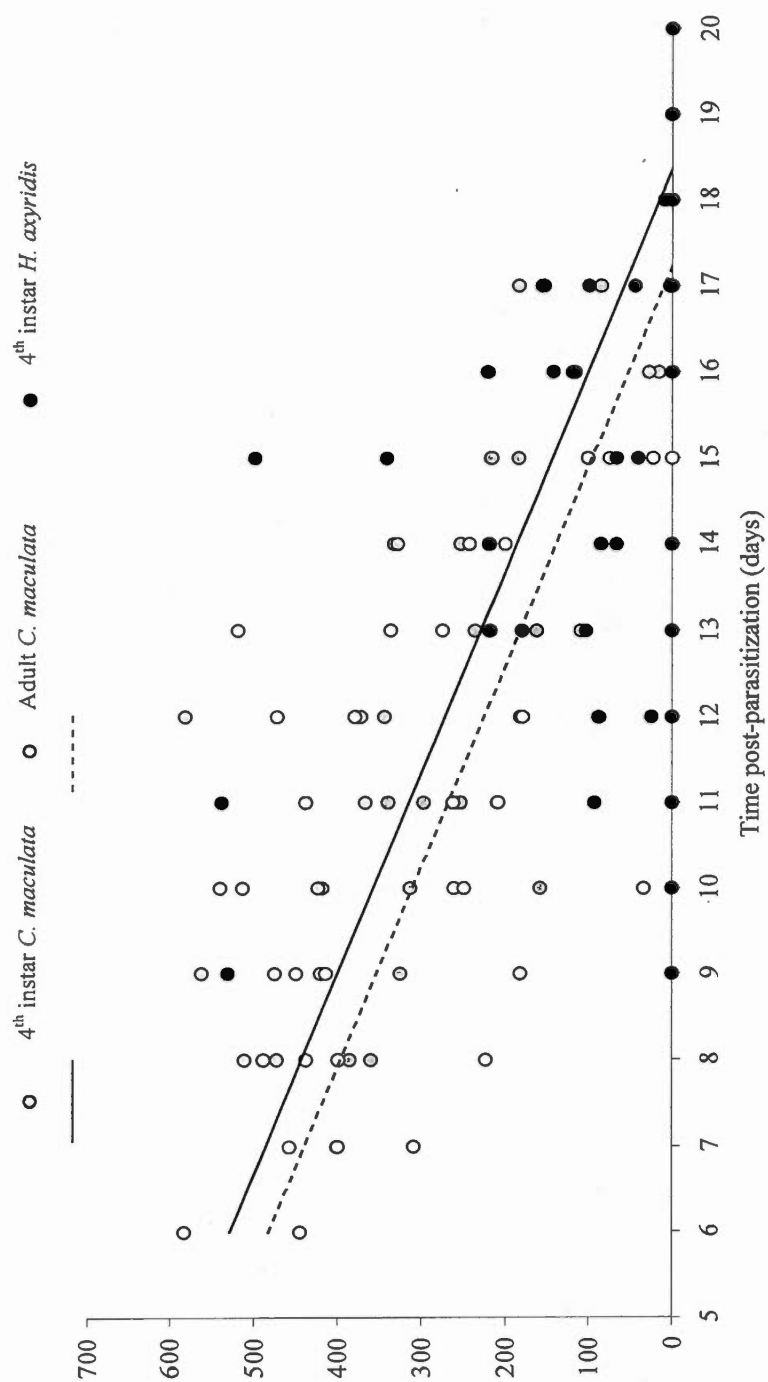


Figure 3.3: *Dinocampus coccinellae* teratocyte number in suitable host *Coleomegilla maculata* and marginal host *Harmonia axyridis* as a function of time post-parasitization (days).

Table 3.2: Linear regression analysis parameters of *D. coccinellae* larval size, teratocyte number and teratocyte diameter evolution as a function of time post-parasitization.

	$y = ax + b$	F	P	r^2
Larval size				
4 th instar <i>C. maculata</i>	$y = 242.08x + 304.29$	61.68	< 0.001	0.59
Adult <i>C. maculata</i>	$y = 234.10x + 300.09$	11.74	0.002	0.23
4 th instar <i>H. axyridis</i>	$y = 215.91x - 191.37$	21.01	< 0.001	0.29
Teratocyte number				
4 th instar <i>C. maculata</i>	$y = -42.82x + 785.87$	37.70	< 0.001	0.51
Adult <i>C. maculata</i>	$y = -42.94x + 739.90$	26.10	< 0.001	0.40
4 th instar <i>H. axyridis</i>	-	1.76	0.191	-
Teratocyte diameter				
4 th instar <i>C. maculata</i>	$y = 26.23x - 47.15$	91.36	< 0.001	0.71
Adult <i>C. maculata</i>	$y = 24.64x - 32.96$	30.97	< 0.001	0.49
4 th instar <i>H. axyridis</i>	$y = 36.50x - 162.36$	4.95	0.035	0.16

The linear increase in size and linear decrease in number of teratocytes observed in *C. maculata* is indicative of a suitable host for *D. coccinellae*. The correlation observed in *C. maculata* is similar to that observed in the suitable host *Coccinella septempunctata brucki* (Kadono-Okuda *et al.*, 1995). In this latter host species, teratocyte diameter increases from 40 to 500 μm at the end of the parasitoid development in response to a polyploidization and the accumulation of proteins inside the cell (Kadono-Okuda *et al.*, 1995; Kadono-Okuda *et al.*, 1998). Teratocyte numbers also decrease progressively after ingestion by *D. coccinellae* larvae during their development (Kadono-Okuda *et al.*, 1995). Declining teratocyte numbers could also be due to apoptosis events observed at the final phase of parasitoid larvae development as shown in previous studies (Volkoff & Colazza, 1992; De Buron & Beckage, 1997). The prediction that the number of teratocytes should be lower in marginal hosts compared with suitable hosts is supported by the present results. Many *H. axyridis* that contain a parasitoid larva are devoid of teratocytes. Similarly, in *Cotesia* and *Microctonus* parasitoid species, a low number of teratocytes is observed during the first days of parasitoid larval development in hosts considered less suitable for offspring development (Alleyne *et al.*, 2001; Barratt & Sutherland, 2001). Strand *et al.* (1985) suggested that a reduced enzymatic activity could cause the serosa membrane to cleave into fewer teratocytes in low quality media. These authors observed fewer mononucleate teratocytes and more polynucleate teratocytes. Further experiments should examine nucleation of teratocytes in *H. axyridis* to establish the proportion of polynucleate teratocytes. Whereas *D. coccinellae* teratocytes can reach 500 μm in suitable hosts (Sluss, 1968; Kadono-Okuda *et al.*, 1995), teratocytes ranging from 600 - 900 μm are observed when *H. axyridis* larvae are parasitized. A similar pattern of excessive growth of teratocytes is also observed in marginal hosts (Alleyne *et al.*, 2001) or when teratocytes are reared in suboptimal artificial media (Strand *et al.*, 1985). An excessive endopolyploidization (Strand and Wong, 1991) or a larger growth in larger host could account for this excessive teratocyte growth in *H. axyridis*.

As predicted, the teratocyte growth pattern is different in marginal vs suitable hosts: the number of teratocytes is higher in the suitable host *C. maculata* compared with the marginal host *H. axyridis* whose adult stage is completely unsuitable for egg-larval *D. coccinellae* development. Attacking the marginal host is costly for the parasitoid female

because either she wastes handling time if no egg is deposited or she may waste an egg if oviposition occurs. Even when parasitizing *H. axyridis* larvae, the high larval mortality and delayed development represent a cost even if the surviving parasitoid has a similar fitness (size and egg load) to those developing in *C. maculata* larvae. Those results are to be taken with caution because of the low number of replicates obtained from successful parasitism in the marginal host larvae. The fact that *D. coccinellae* attacked both larvae and adults of *H. axyridis* could favour the suitable host *C. maculata* because the parasitoid wasted time and eggs doing so (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Heimpel *et al.*, 2003). On the other hand, the capacity of part of the parasitoid population to develop in a marginal host could provide selective advantage to a generalist parasitoid when the suitable host abundance fluctuates in the environment.

Teratocyte growth patterns differ between hosts of different suitability. Because the teratocytes of *D. coccinellae* do not develop normally in the marginal host, the parasitoid larva either fails to develop or develops more slowly. It is proposed that quantifying the teratocyte growth pattern could provide a suitable index of the physiological suitability of other coccinellids known to serve as host to *D. coccinellae* (about 40 coccinellids species). Such an index could have predictive value with respect to parasitoid host range and could also predict the performance of parasitoids on novel hosts following a biological control introduction.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Vaillancourt, J. Frenette, D. Thibodeau and C. Bernier for technical assistance. We also thank Dr. F. Pennacchio for critical reading of the manuscript. This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to Dr. D. Coderre and a grant from the University of Quebec at Montreal (UQÀM) to A. Firlej.

REFERENCES

- Alleyne, M., Wiedenmann, R.N. & Diaz, R.R. (2001) Quantification and development of teratocytes in novel-association host-parasitoid combinations. *Journal of Insect Physiology* **47**, 1419-1427.
- van Alphen, J.J.M. & Vet, L.E.M. (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. *Insect Parasitoid* (ed. by J. K. Waage and D. J. Greathead), pp. 23-61. Academic Press, London.
- Balduf, W.V. (1926) The bionomics of *Dinocampus coccinellae* Schrank. *Annals of the Entomological Society of America*, **19**, 465-498.
- Barratt, B.I.P. & Sutherland, M. (2001) Development of teratocytes associated with *Microctonus aethiopoides* Loan (Hymenoptera: Braconidae) in natural and novel host species. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 257-262.
- Coderre, D., Lucas, E. & Gagné, I. (1995) The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in Canada. *Canadian Entomologist*, **127**, 609-611.
- Dahlman, D.L. (1990) Evaluation of teratocyte functions: an overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **13**, 159-166.
- De Buron, I. & Beckage, N.E. (1997) Developmental changes in teratocytes of the braconid wasp *Cotesia congregata* in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, **43**, 915-930.
- Firlej, A., Boivin, G., Lucas, E. & Coderre, D. (2005) First report of *Harmonia axyridis* Pallas being attacked by *Dinocampus coccinellae* Schrank in Canada. *Biological Invasions*, **7**, 553-556.
- Firlej, A., Chouinard, G., Coderre, D. (2006) A meridic diet for the rearing of *Hyaliodes vitripennis* Say (Hemiptera: Miridae), a predator of mites in apple orchards. *Biocontrol Science and Technology* **16**, 743-751.
- Godfray, H.C.J. (1994) *Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton.
- Gopalapillai, R., Kadono-Okuda, K. & Okuda T. (2005) Molecular cloning and analysis of a novel teratocyte-specific carboxylesterase from the parasitic wasp, *Dinocampus coccinellae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 1171-1180.
- Gordon, R.D. (1985) The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. *Journal of the New York Entomological Society*, **93**, 1-912.
- Heimpel, G.E., Neuhauser, C. & Hoogendoorn, M. (2003) Effects of parasitoid fecundity and host resistance on indirect interactions among hosts sharing a parasitoid. *Ecology Letters*, **6**, 556-566.
- Hodek, I. & Honěk, A. (1996) *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. (2002) Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. *Biological Control*, **25**, 224-230.
- Hotta, M., Okuda, T. & Tanaka, T. (2001) *Cotesia kariyai* teratocytes: growth and development. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 31-41.
- Kadono-Okuda, K., Sakurai, H., Takeda, S. & Okuda, T. (1995) Synchronous growth of a parasitoid, *Perilitus coccinellae*, and teratocytes with the development of the host, *Coccinella septempunctata*. *Entomologia Experimentalis and Applicata* **75**, 145-149.

- Kadono-Okuda, K., Weyda, F. & Okuda, T. (1998) *Dinocampus* (= *Perilitus*) *coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 1073-1080.
- LaMana, M.L. & Miller, J.C. (1996) Field observations on *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in Oregon. *Biological Control*, **6**, 232-237.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Li, S., Falabella, P., Giannantonio, S. *et al.* (2002) Pea aphid clonal resistance to the endophagous parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Insect Physiology*, **48**, 971-980.
- Maeta, Y. (1969) Biological studies on the natural enemies of some Coccinellid beetles. I. On *Perilitus coccinellae* (Schrank). *Kontyû*, **37**, 147-166.
- Musser, F.R. & Shelton, A.M. (2003) Factors altering the temporal and within-plant distribution of coccinellids in corn and their impact on potential intra-guild predation. *Environmental Entomology*, **32**, 575-583.
- Nakamatsu, Y., Fujii, S. & Tanaka, T. (2002) Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *Journal of Insect Physiology*, **48**, 1041-1052.
- Obrycki, J.J., Tauber, M.J. & Tauber, C.A. (1985) *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae): Parasitization and development in relation to host-stage attacked. *Annals of the Entomological Society of America*, **78**, 852-854.
- Okuda, T. & Kadono-Okuda, K. (1995) *Perilitus coccinellae* teratocyte polypeptide: evidence for production of a teratocyte-specific 540 kDa protein. *Journal of Insect Physiology*, **41**, 819-825.
- Pennacchio, F., Vinson, S.B., Tremblay, E. & Ostuni, A. (1994) Alteration of ecdysone metabolism in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae induced by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) teratocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **24**, 383-394.
- Rana, R.L., Dahlman, D.L. & Webb, B.A. (2002) Expression and characterization of a novel teratocyte protein of the braconid, *Microplitis croceipes* (cresson). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1507-1516.
- Scherrer, B. (1984) *Biostatistique*. Gaëtan Morin éditeur, Chicoutimi.
- Sluss, R.R. (1968) Behavioral and anatomical responses of the convergent lady beetle to parasitism by *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **10**, 9-27.
- Sluss, R.R. & Leutenegger, R. (1968) The fine structure of the trophic cells of *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Ultrastructure Research*, **25**, 441-451.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1981) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman & company, New York.
- Strand, M.R. & Pech, L.L. (1995) Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationship. *Annual Review of Entomology*, **40**, 31-56.
- Strand, M.R. & Wong, E.A. (1991). The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*, **37**, 503-515.
- Strand, M.R., Quarles, J.M., Meola, S.M. & Vinson, S.B. (1985) Cultivation of teratocytes of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). *In Vitro Cellular Development and Biology*, **21**, 361-367.

- Tedders, W.L. & Schaefer, P.W. (1994) Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the southern United States. *Entomological News*, **105**, 228-243.
- Vinson, S.B. (1990) How parasitoids deal with the immune systems of their hosts: an overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **13**, 3-27.
- Vinson, S.B. & Iwantsch, G.F. (1980) Host suitability for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **25**, 397-419.
- Volkoff, N. & Colazza, S. (1992) Growth patterns of teratocytes in the immature stages of *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **21**, 323-336.
- Wright, E.J. & Laing, J.E. (1978) The effects of temperature on development, adult longevity and fecundity of *Coleomegilla maculata lengi* and its parasite, *Perilitus coccinellae*. *Proceedings of the Entomological Society of Ontario*, **109**, 33-47.
- Zhang, D., Dahlman, D.L., Järlfors, U.E. *et al.* (1997) Ultrastructure of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Braconidae: Hymenoptera) teratocytes. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **23**, 173-187.

Le chapitre 3 a démontré que l'adéquation de l'hôte exotique *H. axyridis* pour le développement de *D. coccinella* est faible comparativement à celui de la coccinelle indigène *C. maculata*. Seuls les stades larvaires de *H. axyridis* peuvent permettre un développement du parasitoïde. Les adultes de *H. axyridis* n'ont jamais été observés parasités après une séquence de ponte ce qui pourrait s'expliquer par la destruction des œufs de *D. coccinellae* par le système immunitaire des *H. axyridis* adultes. Comme peu de choses sont connues sur le système immunitaire des coccinelles et rien sur celui de *H. axyridis*, nous proposons donc dans le chapitre 4 une étude en microscopie électronique et photonique du système immunitaire de *H. axyridis* afin de déterminer son implication dans la relation avec le parasitoïde *D. coccinellae*.

CHAPITRE 4

The immune response of the coccinellid *Harmonia axyridis* to parasitism by *Dinocampus coccinellae*

Annabelle Firlej, Pierre-Alain Girard, Michel Brehélin, Daniel Coderre
& Guy Boivin

En préparation pour Journal of Invertebrate Pathology

Les auteurs Pierre-Alain Girard et Michel Brehélin du laboratoire d'Ecologie Microbienne des Insectes et Interactions Hôte-Pathogène (UMR1133 INRA-UMII, Pl. E. Bataillon, Montpellier, France 34 095) ont participé tous les deux activement à l'élaboration du protocole expérimental, sa réalisation, la collecte des données et leur interprétation, ainsi qu'à la rédaction de l'article présenté ici sous sa forme actuelle.

RÉSUMÉ

La coccinelle exotique *Harmonia axyridis* Pallas a récemment envahi l'Amérique du Nord et est peu susceptible aux ennemis naturels indigènes. Nous avons étudié l'implication du système immunitaire de *H. axyridis* dans sa résistance au parasitoïde indigène *Dinocampus coccinellae* Schrank. Une étude de l'ultrastructure des hémocytes de *H. axyridis* sous microscope électronique et photonique a identifié cinq différents types cellulaires : les plasmatocytes, les hémocytes granulaires de type I et de type II, les oenocytoïdes et les cellules à sphérule. Seuls les hémocytes granulaires de type II et les plasmatocytes sont impliqués dans la nodulation de bactéries et l'encapsulation des parasitoïdes immatures. Une étude cinétique d'injection de billes de Sephadex® dans des *H. axyridis* adultes a montré une encapsulation complète de 28,5% des billes après 24 h et 81,1% après cinq jours. En comparaison 20,9% des œufs de parasitoïdes sont complètement encapsulés après 24 h mais, cette proportion ne dépasse pas 32,7% après cinq jours. Cette croissance moins rapide dans le taux d'encapsulation qu'avec les billes de Sephadex® peut être due à une rapide augmentation de la taille des œufs de parasitoïdes. Nous avons aussi observé une diminution de l'efficacité du système immunitaire avec une augmentation du nombre d'œufs de parasitoïde pondus. Nos résultats suggèrent que le système immunitaire de *H. axyridis* joue un rôle dans la capacité de cette espèce à échapper aux endoparasitoïdes indigènes d'Amérique du Nord.

MOTS-CLEFS: *Dinocampus coccinellae*, *Harmonia axyridis*, Espèce invasive, Encapsulation, Hémocytes, Parasitoïde, Coccinellidae.

ABSTRACT

The exotic ladybeetle *Harmonia axyridis* Pallas recently invaded North America and has a low susceptibility to indigenous natural enemies. We investigated the role of the immune system of *H. axyridis* in its resistance to the indigenous parasitoid *Dinocampus coccinellae* Schrank. An ultrastructural study of *H. axyridis* hemocytes under electron and light microscopy identified five different cellular types: plasmatocytes, granular hemocytes I, and granular hemocytes II, oenocytoids and spherule cells. Only the granular hemocytes II and plasmatocytes are involved in the nodulation of bacteria and encapsulation of immature parasitoids. Kinetic study after injection of Sephadex® beads in *H. axyridis* adults showed complete encapsulation of 28.5% of the beads after 24 h and 81.1% after five days. In comparison 20,9% of parasitoid eggs were completely encapsulated after 24 h and 32.7% after five days. This slow increase in the encapsulation rate compared to beads could be due to the rapid increase in size of parasitoid eggs. We also observed a decrease in the immune system efficiency with an increasing number of parasitoid eggs laid. Our results suggest that the immune system of *H. axyridis* has favored its escape from endoparasitoids indigenous to North America.

KEY-WORDS: *Dinocampus coccinellae*, *Harmonia axyridis*, Invasive species, Encapsulation, Hemocytes, Parasitoid, Coccinellidae.

INTRODUCTION

The physiological defense of insects is based on an innate immune system that reacts to the presence of inert material or living organisms by phagocytosis, nodulation, humoral or cellular encapsulation (Ratcliffe and Rowley, 1979; Gupta, 1991; Schmidt et al., 2001; Lavine and Strand, 2002). Endoparasitoids are organisms that develop inside another organism, their host, and eventually kill it. Female parasitoids deposit eggs inside the body of their hosts and these eggs can be the target of the host immune response. Once activated, hemocytes gradually cover the egg, encapsulating it and causing death by asphyxia (Strand and Pech, 1995; Lavine and Strand, 2002). Hemocyte morphology, capsule formation and the coevolution between host resistance and parasitoid virulence have been best studied in lepidopteran and dipteran hosts (Brehélin and Zachary, 1986; Davies and Vinson, 1986; Ribeiro et al., 1996; Eslin and Prevost, 1998; 2000; Pech and Strand, 2000; Russo et al., 2001; Lavine and Strand, 2002; Meister and Lagueux, 2003; Moreau et al., 2003; Ribeiro and Brehélin, 2006).

Information about the coleopteran immune system is scanty and restricted to a few species of Tenebrionidae (*Tenebrio molitor* L. and *Zophobas morio* F.) (Ratcliffe and Rowley, 1979; Zhao and Wang, 1992) and Scarabaeidae (*Melolontha melolontha* (L.) and *Cetonia ciliata* Drury) (Devauchelle, 1971; Brehélin and Zachary, 1986; Giulianini et al., 2003). The immune system of the coleopteran family Coccinellidae has received little attention, even though coccinellid beetles are susceptible to various natural enemies (nematodes, fungi, parasitoids, etc) (Hodek and Honěk, 1996). The presence of hemocytes has been mentioned in *Adalia bipunctata* L. (Hurst et al., 1996) and *Coccinella septempunctata* L. (Karystinou et al., 2004), but their role against pathogens or parasitoids is unknown.

Although the immune system of insects is innate and responds to all foreign organisms, a degree of coevolution between host and parasitoid does exist. Patterns of geographical variation in host resistance and parasitoid virulence have been described, and parasitoids show different adaptive strategies to circumvent the host immune system (Eslin and Prevost, 1996; Kraaijeveld and Godfray, 1999; Moreau et al., 2003). The study of the

immune system of an exotic coccinellid host species that did not coevolve with an indigenous parasitoid may be relevant to understand the innate immune system of coccinellid beetles.

The asiatic multicolored ladybeetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coccinellidae) and the parasitoid *Dinocampus coccinellae* Schrank (Braconidae) have coexisted in North America for at least 28 years. *Dinocampus coccinellae* is a widespread indigenous parasitoid of coccinellids in North America (Smith, 1960; Richerson and DeLoach, 1973; Obrycki and Tauber, 1979; Wright and Laing, 1982). *Harmonia axyridis* is an asiatic species repeatedly introduced into the United States from 1916 to 1982, for biological control purposes. This species was recovered first in 1988 and progressively invaded northern U.S. and Canada (Chapin and Brou, 1991; Tedders and Schaefer, 1994; Coderre et al., 1995; Dreistadt et al., 1995). Establishment of this exotic coccinellid is also reported in South America (de Almeida and da Silva, 2002) and Europe (Adriaens et al., 2003; Majerus and Roy, 2005). In these new habitats, *H. axyridis* shows little susceptibility to indigenous parasitoids, fungi and nematodes compared to native coccinellids (LaMana and Miller, 1996; Hoogendoorn and Heimpel, 2002; Nalepa and Kidd, 2002; Cottrell and Ilan-Shapiro, 2003; Firlej et al., 2005; Shapiro-Ilan and Cottrell, 2005).

According to the “enemy release hypothesis” (Keane and Crawley, 2002; Prenter et al., 2004; Torchin and Mitchell, 2004), the establishment and invasion of North America by *H. axyridis* could have been favored by a “parasite filter effect” during its introduction and by its lower susceptibility to natural enemies in the invaded area. The low susceptibility of invasive species to indigenous natural enemies could be due, at least in part, to their immune system (Lee & Klasing, 2004), and understanding the characteristics of the immune system that prevent parasitoids from successfully developing in an invasive species could facilitate the selection of parasitoid species for classical biological control. Here, we 1) characterize the hemocyte types of *H. axyridis* adult and examine their function in the encapsulation of foreign bodies (Sephadex® beads, bacteria and *D. coccinellae* eggs), 2) study the kinetics of encapsulation of Sephadex® beads and *D. coccinellae* eggs, and 3) evaluate the relation between the number of *D. coccinellae* eggs laid within a host and the ability of *H. axyridis* adults to encapsulate them.

MATERIALS AND METHODS

Insect colonies

Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) and *D. coccinellae* (Braconidae: Euphorinae) were captured in corn fields in Quebec, Canada (45°21'N; 73°09'W) and reared in the laboratory for approximately two years with regular introductions of wild individuals to maintain genetic variability. Coccinellids were reared on a liver-based artificial diet (Firlej et al., 2006), grounded pollen, moth eggs (*Ephestia kuehniella* Keller) and aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris). *Dinocampus coccinellae* was reared on adults of an indigenous coccinellid, *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake. Standard conditions for insects rearing and experiments were $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ RH and a LD 16:8 h photoperiod.

Bacterial strain and FITC

The bacterial strain used in this study was *Escherichia coli* XL1 Blue (Gram-negative bacteria). Bacteria were harvested from exponential phase cultures, heat killed for 1 h at 70°C , centrifuged (16000 g for 5 min), washed three times in carbonate buffer, pH 9.4, and resuspended in the same buffer. Fluorescein isothiocyanate (FITC) was added to a final concentration of 0.15 mg/ml and the bacteria were incubated for 30 min at room temperature on a rotary shaker (Richards and Edwards 2000). Cells were then washed three times in carbonate buffer to remove all traces of free FITC, adjusted to $2 \times 10^8/\text{ml}$ in PBS buffer and stored at -20°C until use.

Hemocytes identification with photonic and transmission electron microscopy (TEM)

The abdomen of a live *H. axyridis* adult was opened directly into anticoagulant buffer (62 mM NaCl, 100 mM glucose, 10 mM EDTA, 30 mM trisodium citrate, 26 mM citric acid) and the abdomen was gently blended. A droplet of this solution was applied onto a coverslip for direct observation of hemocytes in phase contrast microscopy. For TEM observation, two *H. axyridis* adult abdomens were opened into anticoagulant buffer and gently blended to obtain enough hemolymph. After centrifugation (10 sec at 800g), hemocyte pellets were fixed in 5% glutaraldehyde for 24 h, postfixed in 1% osmic acid for 1 h, deshydrated in a graded ethanol and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained according to the method

of Reynolds (1963) and examined with a JEOL 200-CX transmission electron microscope at 70 kV.

Phagocytic reaction and fluorescent quenching with photonic and transmission electron microscopy (TEM)

Phagocytosis function of hemocytes was studied in electron microscopy and in light microscopy by fluorescent quenching method. *Harmonia axyridis* adults were injected with 10 μ l of fluorescent bacteria *E. coli*-FITC (2×10^6 bacteria) and were incubated at 20°C. After 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, and 16 h, individuals were dissected in anticoagulant buffer. A fraction of hemolymph mixed to anticoagulant buffer was collected with a Pipetman and applied onto a glass. After 10 min of incubation at room temperature in a humid chamber to allow hemocytes spreading, cells were washed with PBS buffer and incubated for 4 min with 200 μ l of trypan blue (0.05% in PBS buffer). Cells were then washed with PBS buffer and phagocytosis was observed in phase-contrast and fluorescent microscopy. For TEM, 3 h and 6 h after injection of bacteria, hemocytes were processed as described above.

Kinetics of Sephadex® bead encapsulation

Harmonia axyridis adults were injected with 10 μ l of PBS buffer containing beads of Sephadex®-DEAE A-25 ion exchange resin (from 32 to 47 beads by injection). Adults were incubated at $24 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ RH and a LD 16:8 h photoperiod with the diet described above and dissected at 6 h, 1, 2, 3, 4 and 5 days post-injection into anticoagulant buffer. Ten replicates were done for each dissection. The kinetics of capsule formation were examined by evaluating layers of hemocytes accumulating around the foreign body (Eslin and Prevost, 2000; Moreau et al., 2003). The degrees of encapsulation of Sephadex® beads were categorized as follows: “absence of hemocytes” (= total lack of hemocytes at the surface of the bead), “presence of some hemocytes” (= less than one layer of hemocytes at the surface of the bead), “beginning of cellular encapsulation” (= between one and two layers of hemocytes at the surface of the bead), “complete cellular encapsulation” (= more than two layers of hemocytes covering the surface of the bead).

Kinetics of *D. coccinellae* egg encapsulation

One two day-old parasitoid female and one seven day-old *H. axyridis* adult were placed together in a Petri dish to allow egg deposition for 6 h or 24 h. These two durations of contact were chosen to manipulate the number of eggs laid. At the end of the test, *H. axyridis* adults were incubated under standard conditions with the diet described above and dissected at 6 h, 1, 2, 3, 4 and 5 days post-injection into anticoagulant buffer. Ten replicates were done for each dissection date with a new parasitoid female each time. The degrees of encapsulation of *D. coccinellae* eggs were categorized as described above for sephadex beads. Mean number of eggs laid in the two treatments (6 h and 24 h) was compared with a Student t-test ($\alpha = 0.05$) (Sokal and Rohlf, 1981). The rate of encapsulation at 5 days post-oviposition was compared between treatments (6 h and 24 h) using a Chi-square test ($\alpha = 0.05$) (Sokal and Rohlf, 1981). All statistical tests were performed with the JMPin software (SAS Institute Inc.) (Sall and Lehman, 1996).

The different hemocyte types were first described using ultrastructural features according to the classification of Brehélin and Zachary (1986). In a second step they were observed under light microscopy after collection in anticoagulant buffer, which preserves the shape of the cells seen *in vivo*. Finally, hemocytes were described after 2 h incubation in a vital buffer (PBS) to *in vitro* study.

RESULTS

Hemocytes identification using photonic and transmission electron microscopy (TEM)

Plasmatocytes (Pl)

TEM: Plasmatocytes show short cytoplasmic expansions (pseudopods). They are deprived of inclusions other than rare heterogeneous bodies of resorptive nature (secondary lysosomes) and their Golgi apparatus is often well developed. The rough endoplasmic reticulum (RER) is present in narrow cisternae (fig. 4.1).

Light microscopy: In anticoagulant buffer these cells are oval with a mean size of $5 \times 10 \mu\text{m}$ (fig. 4.2). They have a low refringence, due to absence of cytoplasmic inclusions. When incubated in vital buffer (PBS), they spread on slides (see fig. 4.3 A and 4.3 B) and sometimes appear as fibroblastic-like flat cells.

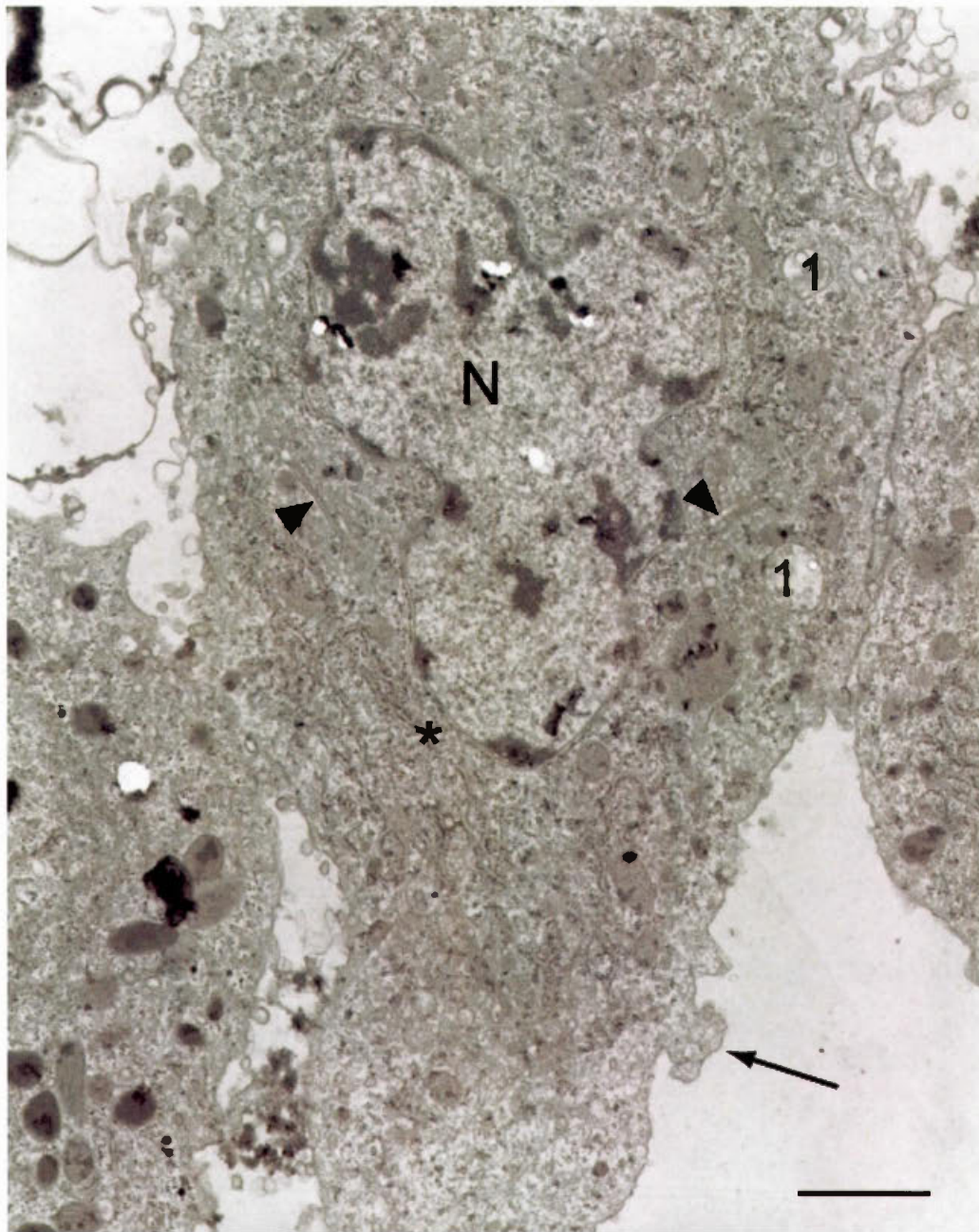


Figure 4.1: TEM of plasmatocyte (PI) from *H. axyridis* adults: cell with short pseudopods (arrow), well developed golgi (arrowheads), rough endoplasmic reticulum (RER) in narrow cisternae (asterisk) and heterogeneous bodies like secondary lysosomes (1); N=nucleus. Bar = 1 μm .

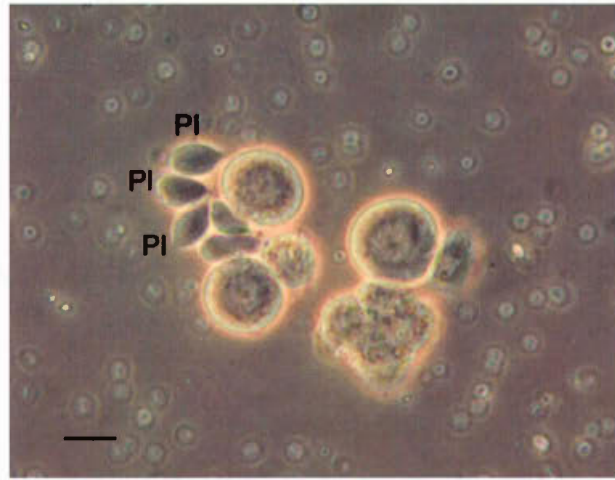


Figure 4.2: Plasmatocytes (PI) of *H. axyridis* in phase contrast microscopy. Hemocytes were collected from adult insect in anticoagulant buffer and applied on coverslip. Bar = 10 μm .

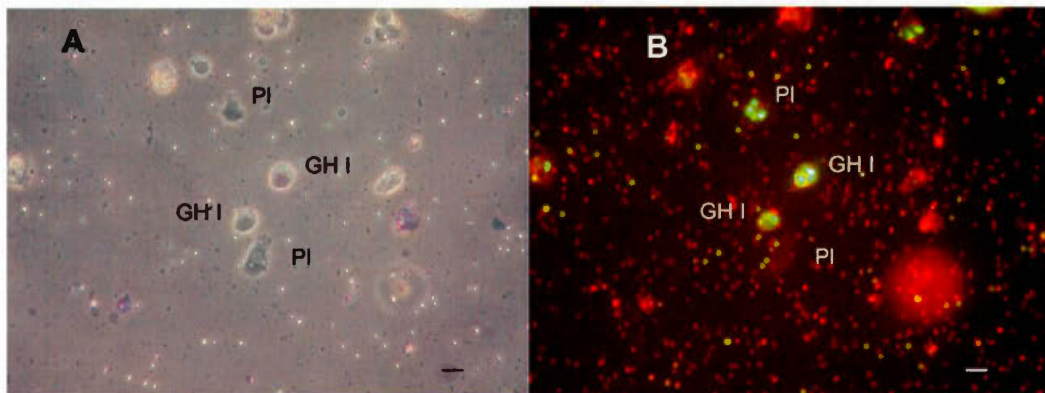


Figure 4.3: Phagocytosis by hemocytes 4 h after *H. axyridis* adult injection with killed FITC-labelled *E. coli*. A = hemocytes in phase contrast and B = in epifluorescence after quenching by Trypan blue. Two granular hemocytes I (GHI) and one plasmatocyte (PI) have engulfed bacteria. Bar = 10 μm .

Functions: They are present in capsules and nodules built around foreign bodies, in association with GH II (see description of GH II). Some of them display phagocytosis (fig. 4.3 A and 4.3 B).

Granular hemocytes I (GH I)

TEM: These cells have most of the classical features of granulocytes, common in most insect species: rounded cells with a rough endoplasmic reticulum developed in numerous and large cisternae and with the presence of three different cytoplasmic granular inclusions (fig. 4.4 A). The typical granules originate from golgi complex and show an internal microtubular structure (fig. 4.4 B). Surprisingly, pseudopods and pinocytotic vesicles are rare when cells are fixed immediately after hemolymph collection.

Light microscopy: GH I are round cells with a mean diameter of 8 μm and irregular surface. Under phase contrast microscopy, they appear as refringent cells, due to their cytoplasmic granular inclusions. After incubation they appear fixed on slide by short pseudopods (fig. 4.5).

Functions: They seem to be the most important cell type involved in phagocytosis of bacteria, under our experimental conditions (fig. 4.3 A-4.3 B; 4.6 A-4.6 B).

Granular hemocytes II (GH II)

TEM: They look like Pl with variable numbers of cytoplasmic granular inclusions. These inclusions are always electron-dense membrane-bound granules (mean diameter: 0.4 μm). Areas of glycogen are often observed inside the hyaloplasm (fig. 4.7).

Light microscopy: As Pl, GH II are oval cells (8 X 12 μm). In phase contrast microscopy they are also refringent cells but they differ from GH I by the size of their inclusions which are easy to observe in light microscopy (fig. 4.8). As Pl they also can spread on glass slides.

Functions: These cells seem to be the most numerous cells in hemolymph. Together with Pl, they build nodules (fig. 4.9) and capsules around foreign bodies too large to be phagocytosed.

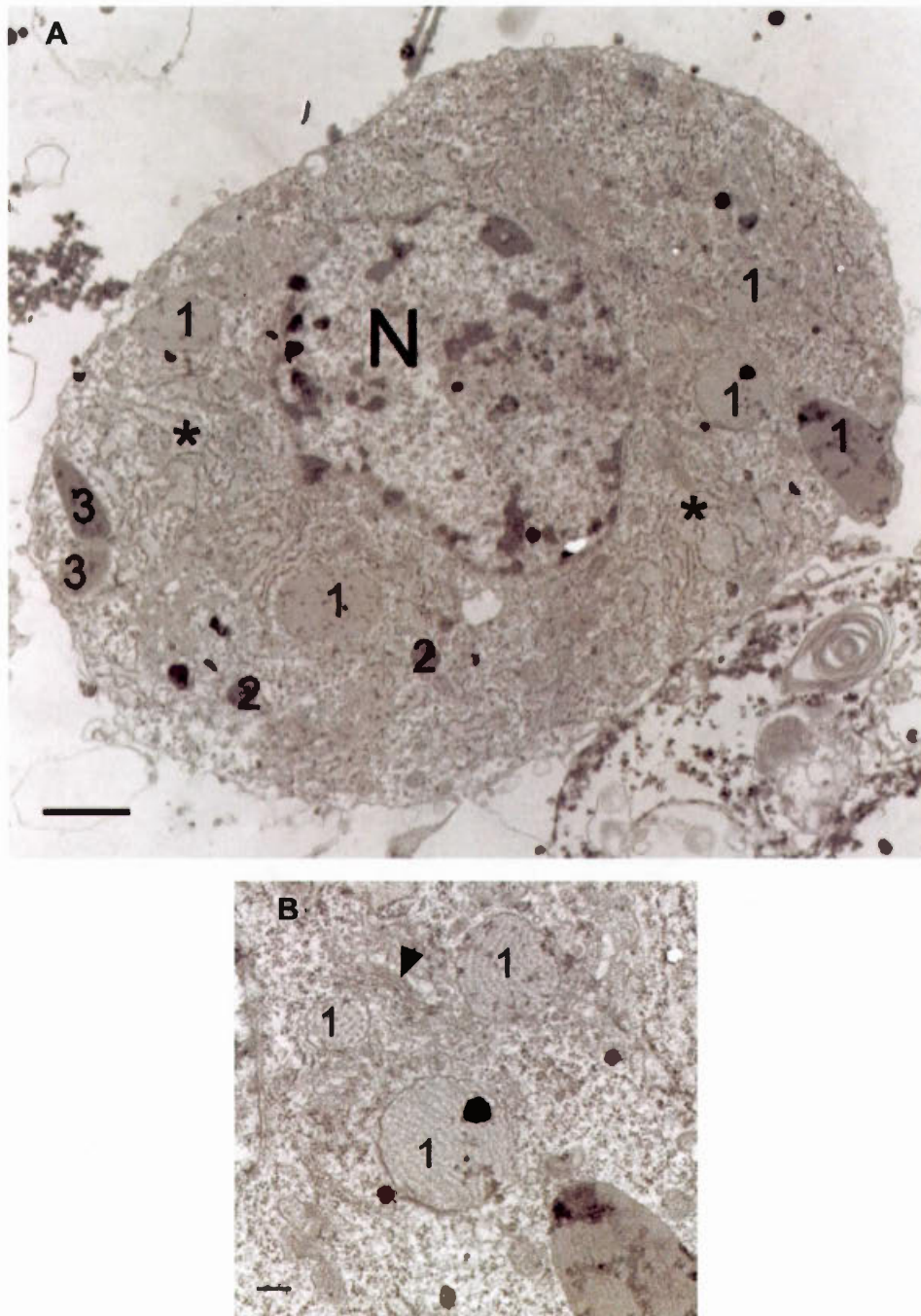


Figure 4.4: TEM of granular hemocyte I (GH I) from *H. axyridis* adults. A = GH I with RER well developed in large cisternae (asterisk) and three different types of granular inclusion (1 to 3). Bar = 1 μm. B = view of structured granules (1) with a microtubular internal structure and in relation with golgi complex (arrowheads); N=nucleus. Bar = 200 nm.



Figure 4.5: Two GH I in phase contrast microscopy adhering to a microscope slide by means of short pseudopods. Bar = 8 μm .

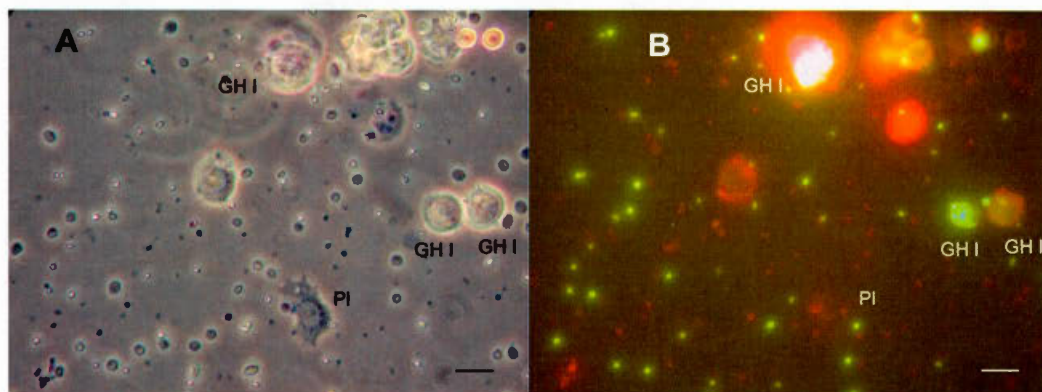


Figure 4.6: Phagocytosis by GH I 2 h after injection of *H. axyridis* adult with killed FITC-labelled *E. coli*. A = hemocytes in phase contrast and B = in epifluorescence after quenching by Trypan blue. Several bacteria are present in each GH I. Bar = 10 μm .

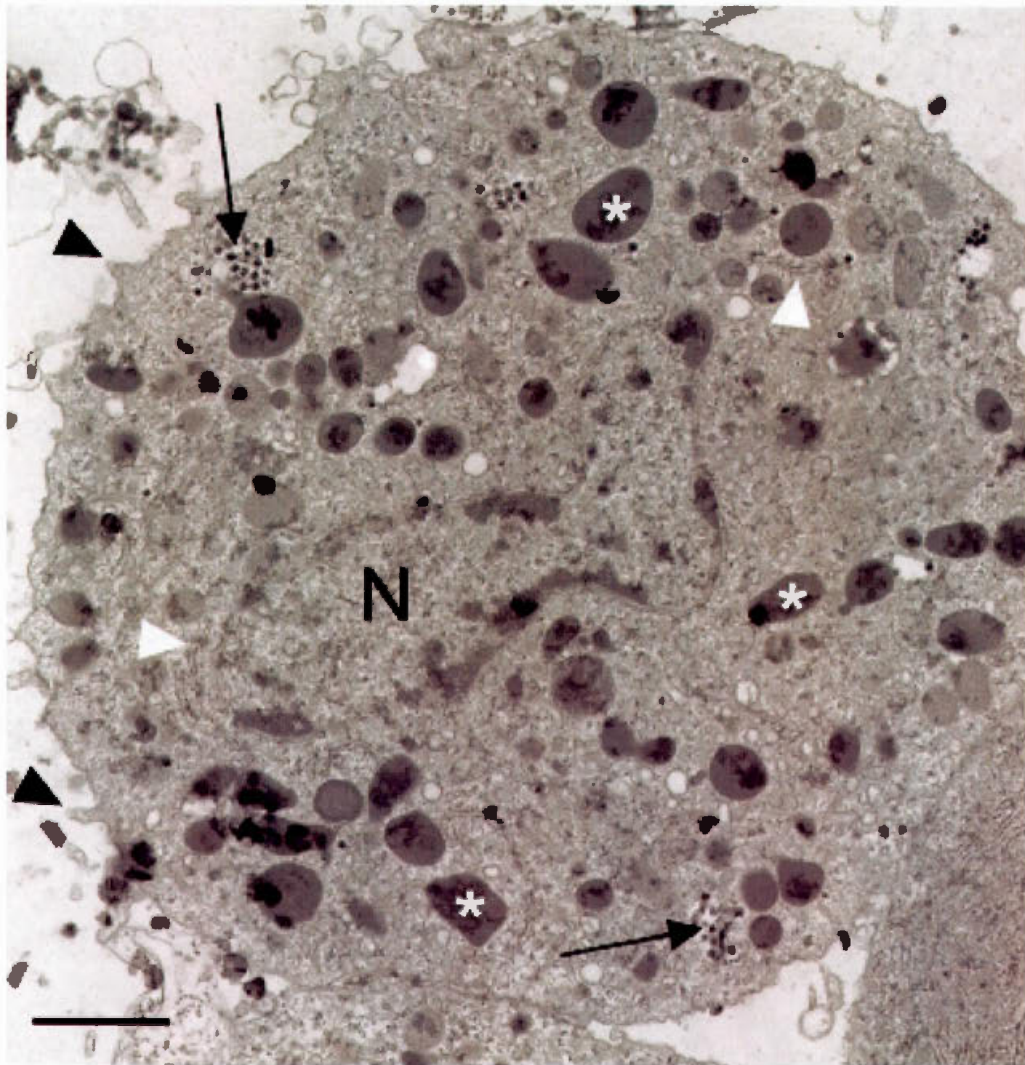


Figure 4.7: TEM of granular hemocyte II (GH II) from *H. axyridis* adults. Cell with characteristics similar to Pl: short pseudopods (black arrowhead) and few RER in narrow cisternae (white arrowheads), but also with some area of glycogen (arrow) and numerous electron dense granular inclusions (white asterisk); N=nucleus. Bar = 1 μ m.

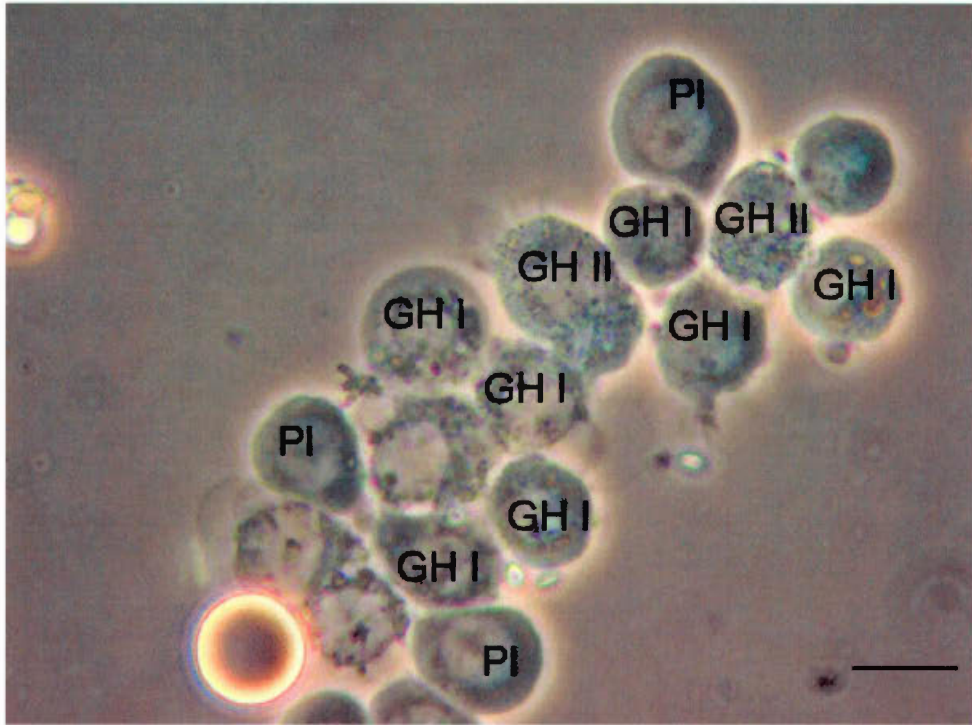


Figure 4.8: Hemocytes from *H. axyridis* adults in phase contrast microscopy. Two GH II among GH I and PI: the size of their granular inclusions allows easy recognition of these cells. Bar = 10 μm .

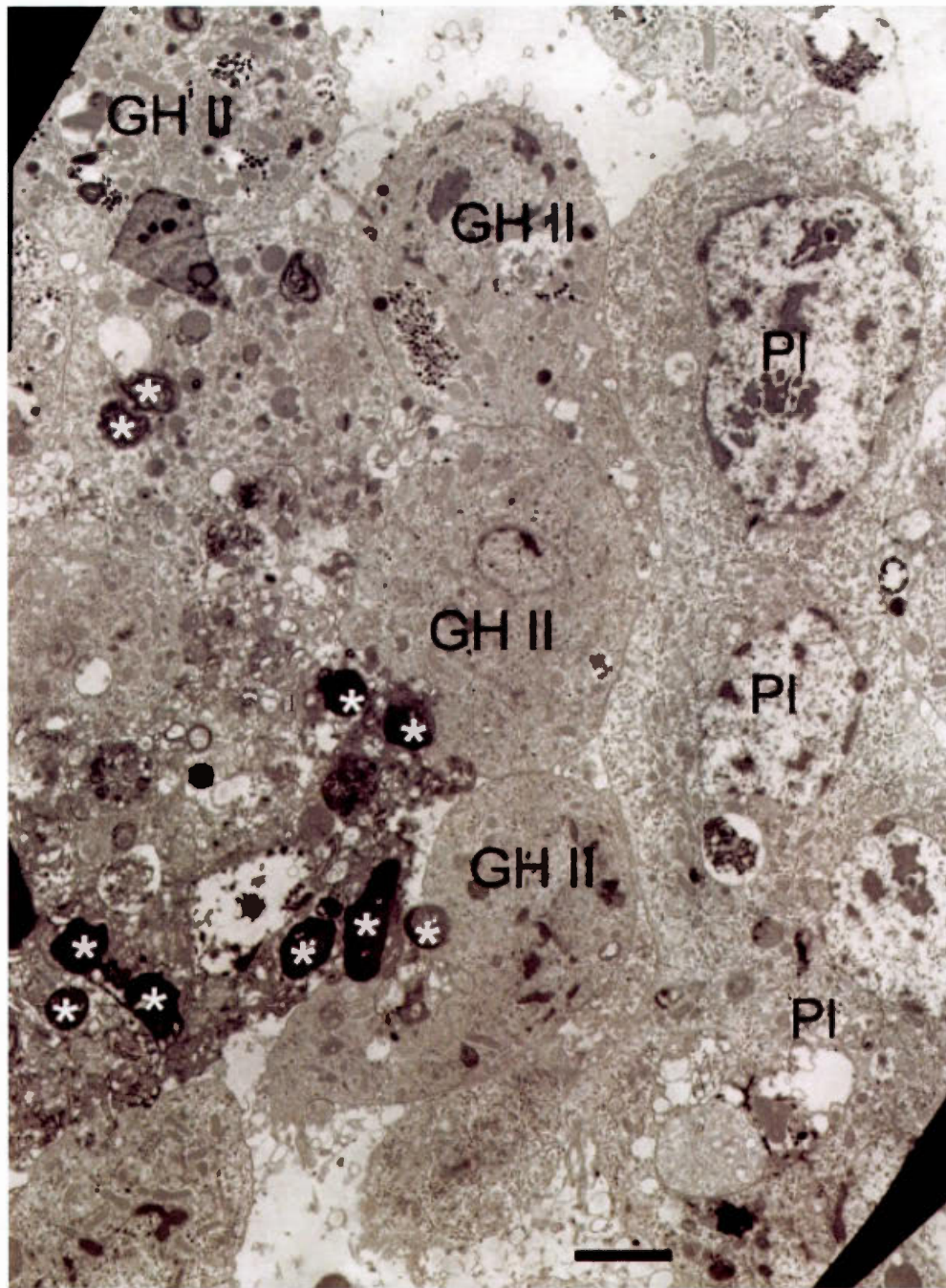


Figure 4.9: GH II and PI beginning nodule formation around killed FITC labelled *E. coli* (white asterisk) and hemocytes in necrosis (TEM). Bar = 2 μm .

Oenocytoids (Oe)

TEM: Oenocytoids are round cells of large size (diameter up to 18 μm). Their nucleus has an eccentric location. In a homogeneous hyaloplasm, the typical cytoplasmic organelles are rare with the exception of the free ribosomes often associated in clusters of polysomes (fig. 4.10).

Light microscopy: Under our experimental conditions, Oe were not observed in light microscopy.

Functions: They have not been examined.

Spherule Cells (Sph)

TEM: These hemocytes have a very well developed RER (fig. 4.11). Their main characteristic is the presence of large round or oval inclusions (3 X 1.5 μm) very often located in the vicinity of the plasma membrane. Some of these inclusions seem to be extruded from the cells and several of these granules are observed free in the plasma between hemocytes. Both cytoplasmic and free granules exhibit an internal structure with different appearances depending on the section (see fig. 4.15). Other large round inclusions show an internal structure identical to that of structured granules of GH I.

Light microscopy: They are the largest observable cells in *H. axyridis* hemolymph, with a diameter of up to 25 μm . Their large cytoplasmic inclusions are easily observed, most often at the cell periphery, in contact with plasma membrane (fig. 4.12). They seem to be fragile cells that can release their inclusions (fig. 4.13), which are very numerous in the circulating hemolymph.

Functions: Sph did not engulf injected bacteria and did not seem to participate in capsule formation. Other functions have not been tested. However, based on their ultrastructural features (hypertrophy of their RER) and the presence in hemolymph of numerous free granules similar to Sph inclusions, these hemocytes appear to have a function of synthesis of plasma components (see Discussion).

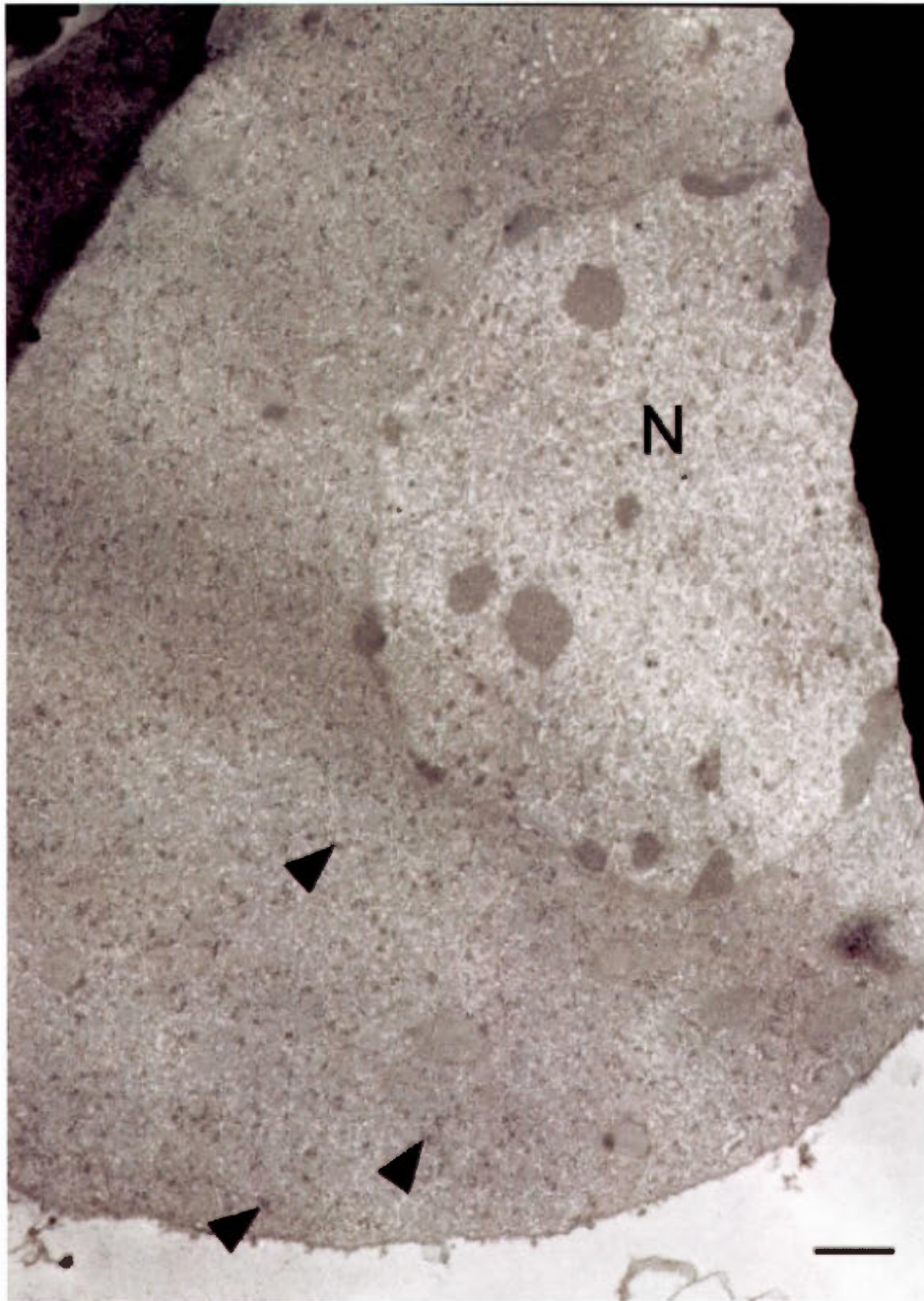


Figure 4.10: TEM of oenocytoid (Oe) from *H. axyridis* adults. This hemocyte can be recognized by its regular size, shape, eccentric nucleus (N) and the paucity of cytoplasmic organelles with exception of the ribosomes associated in polysomes (arrowheads); N=nucleus. Bar = 500 nm.

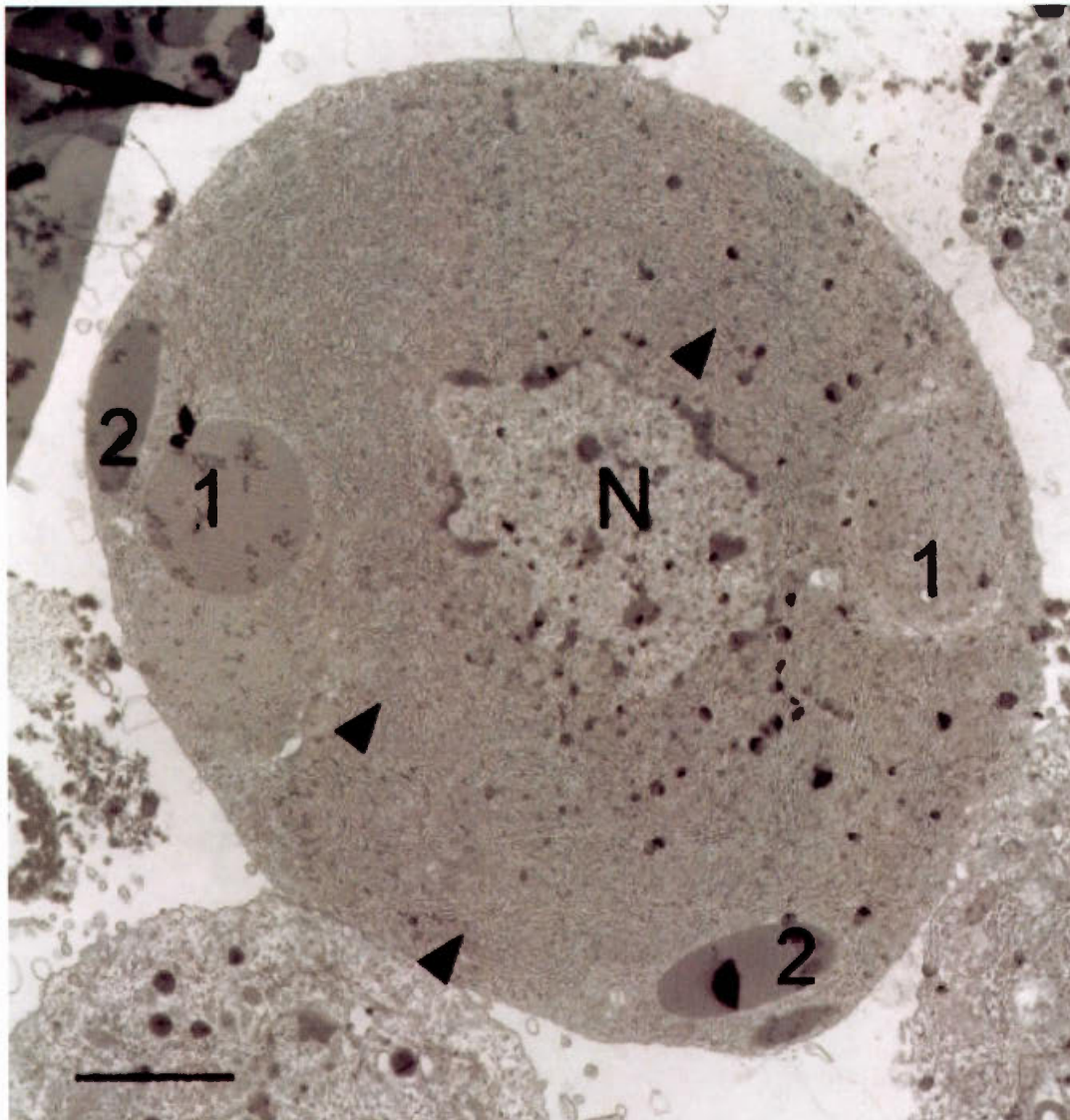


Figure 4.11: TEM of spherule cell (Sph) from *H. axyridis* adults. Cells with hypertrophied RER (arrowheads) and two different structured granules, (1) = granules similar to GH I granules but larger, (2): oval granule with an internal structure and localized in cell periphery; N=nucleus. Bar = 2 μ m.

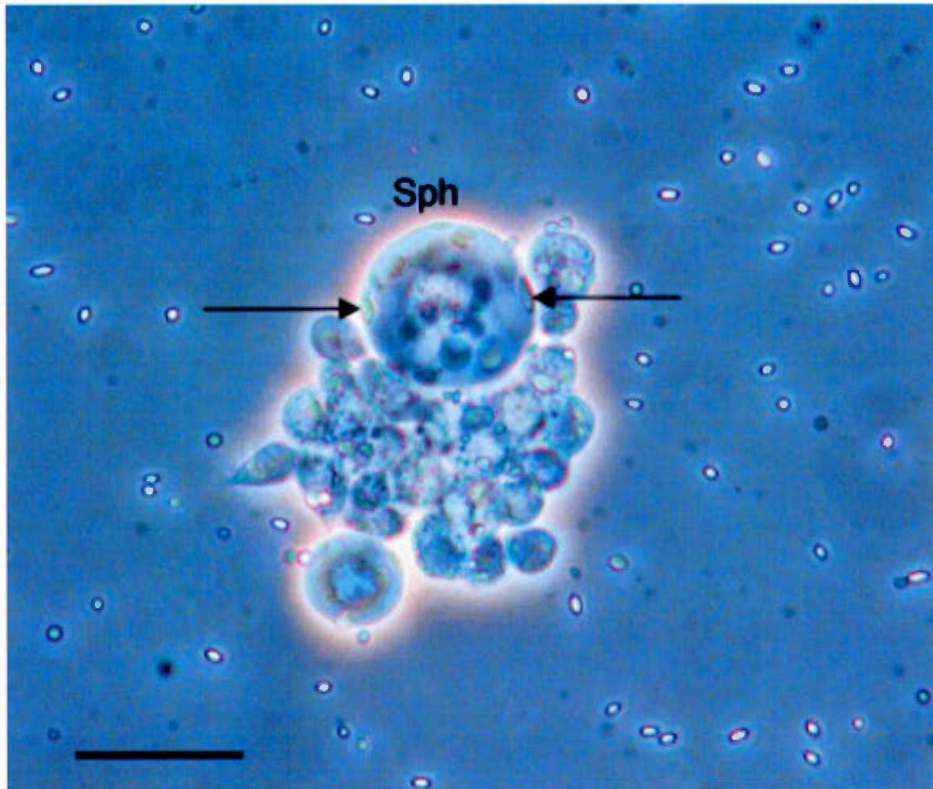


Figure 4.12: Cluster of hemocytes 30 min after *H. axyridis* adult injection with killed FITC labelled *E. coli*. Large Sph (top) shows characteristic oval dense granules located at the periphery of the cell (arrows). Note the presence of an other cell (bottom) of a smaller size than Sph but that also shows the presence of the same granules. Bar = 25 μ m.

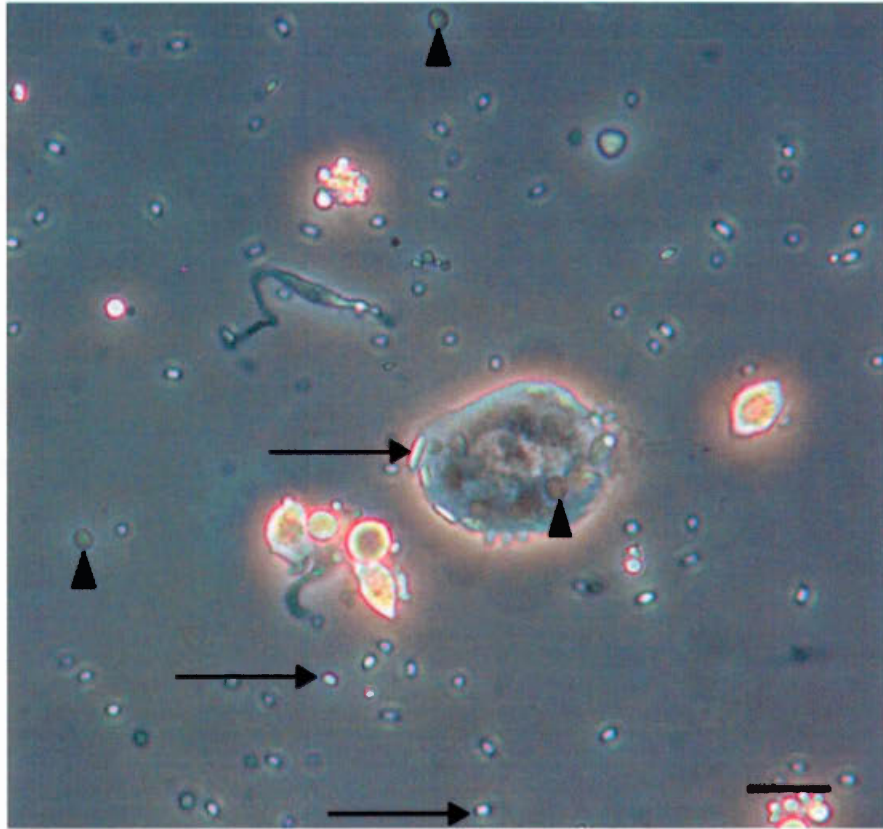


Figure 4.13: Sph recovered from *H. axyridis* adult in phase contrast microscopy: oval (arrows) and rounded (arrowheads) granules seem to be released by the cell and are numerous and free in hemolymph (see also fig. 15). Bar = 10 μ m.

Other hemocyte types

In addition to the above-described hemocytes that belong to well defined cell types, other cells circulating in the haemolymph of *H. axyridis* exhibit features that suggest two different types. Cells of the first "intermediate" type look like Pl but contain granular inclusions, although fewer than generally observed in GH II (fig. 4.14). The other group of "intermediate" cells exhibits the ultratructural features, and especially the inclusions, of both GH I and of Sph (fig. 4.15).



Figure 4.14: TEM of cells from *H. axyridis* adults, intermediate between PI and GH II. This cell possesses a morphology similar to PI except for granular inclusions (arrowheads) that are similar to GH II granules; N=nucleus. Bar = 1 μ m.

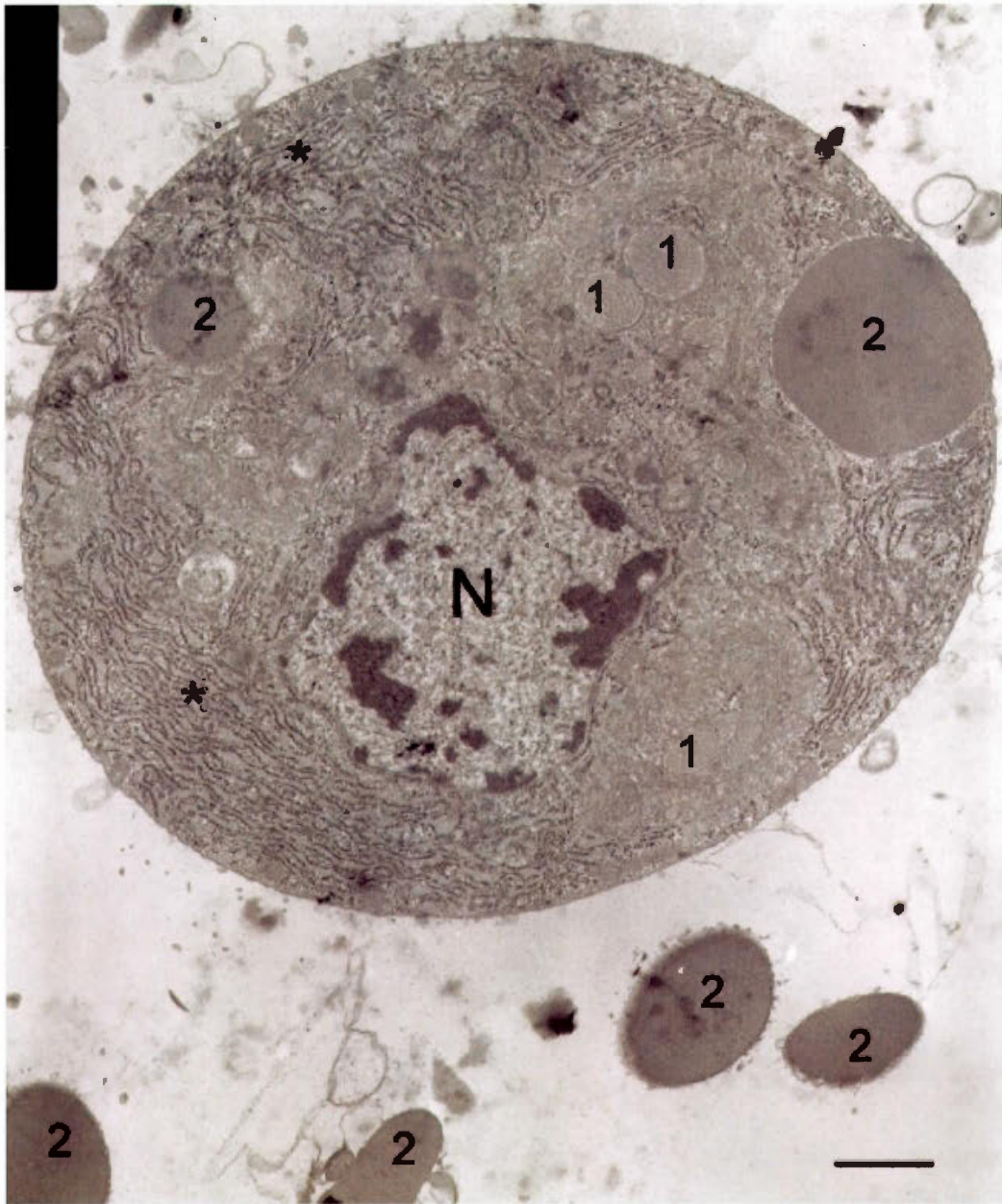


Figure 4.15: TEM of cell from *H. axyridis* adults, intermediate between GH I and Sph. This cell possesses organelles similar to GH I such as granular inclusions (1) in relation with golgi complex and features similar to Sph, with RER hypertrophied (asterisk) and internally structured granules (2) also seen free in the plasma bathing the hemocytes; N=nucleus. Bar = 1 μ m.

Kinetics of Sephadex® bead encapsulation

The proportion of Sephadex® beads that were encapsulated by *H. axyridis* adults increased with time post injection (6 h to 5 days after bead injection) (fig. 4.16). At 6 h post injection, 42% of the beads were surrounded by hemocytes while 1 day after injection, this proportion rose to 82%. Almost 80% of the beads were completely encapsulated at 5 days post injection at which time the eggs of the parasitoid normally hatch.

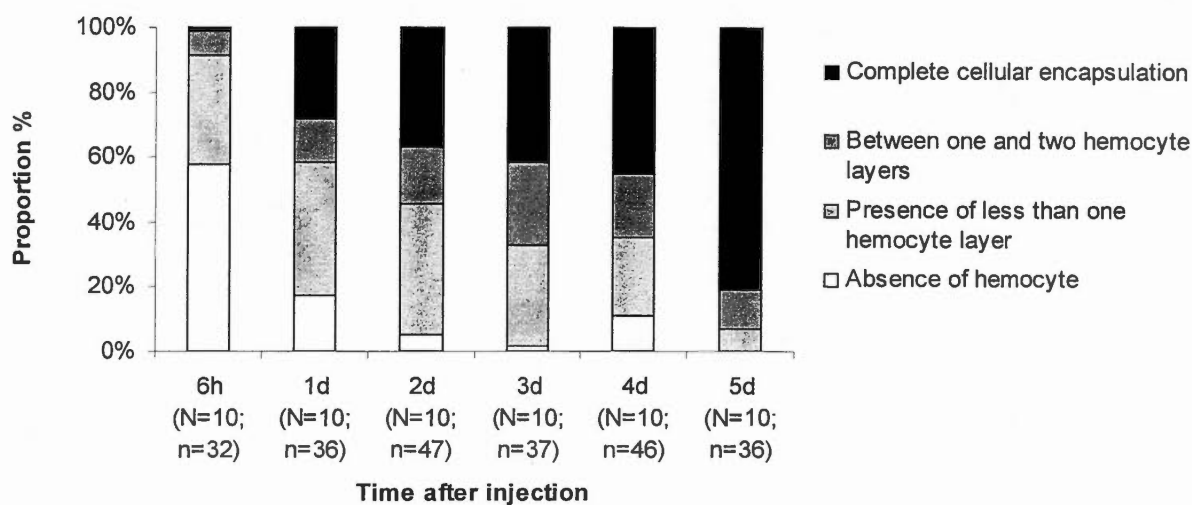
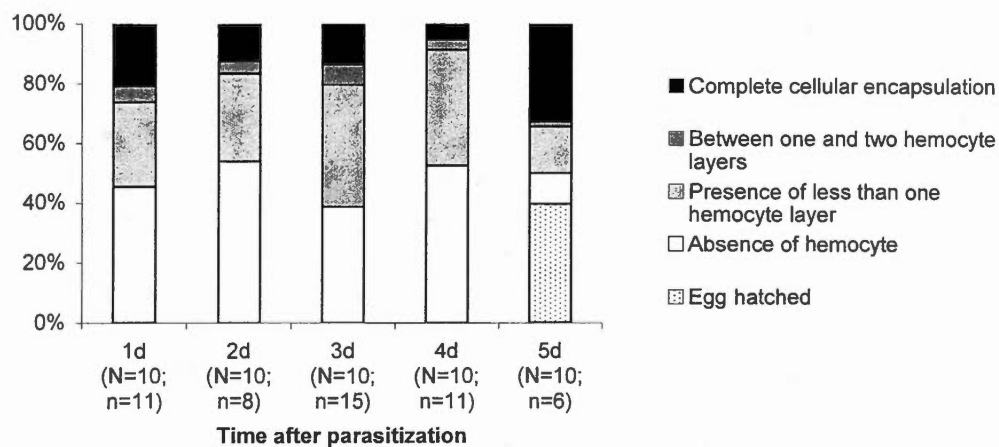


Figure 4.16: Kinetics of Sephadex® bead encapsulation in *H. axyridis*. (For each time: N=number of replicates; n=mean number of beads recovered).

Kinetics of *D. coccinellae* egg encapsulation

After 6 h of contact, 10.2 ± 6.9 eggs were laid in the *H. axyridis* adults, a value that was significantly less than the 32.6 ± 18.0 eggs laid after 24 h of contact (t-test: $t=8.202$; $df=1, 98$; $p<0.0001$). The proportion of parasitoid eggs that were encapsulated by *H. axyridis* adults varied as a function of time post parasitization (1 to 5 days) (fig. 4.17 A). For both 6 h and 24 h oviposition periods, the proportion of encapsulated eggs did not increase progressively from 1 to 5 days, unlike what observed for Sephadex® beads (see above). The degree of egg encapsulation was highly variable. The proportion of parasitoid eggs that were encapsulated by *H. axyridis* adults varied also with the time of contact between the host and parasitoid (6 h or 24 h) (fig. 4.17 B). At 1 day post parasitization, 45% of the eggs were free of hemocytes in contact of 6 h and 64% in contact of 24 h. At this time, 21% of the eggs were completely encapsulated in contact of 6 h comparatively to 1% in contact of 24 h. After 2, 3 and 4 days post parasitization, the percentage of eggs free of hemocytes varied from 39 to 54% for contact of 6 h and from 54 to 79% for contact of 24 h. At 5 days post parasitization, the rate of egg parasitoid encapsulation differed significantly for the two oviposition periods (χ^2 : $\chi^2 = 53.16$; $df=1, 354$; $p<0.0001$). After contact of 6 h, 33% of the eggs laid were completely encapsulated (fig. 4.17 A), compared to 3.7% after contact of 24 h (fig. 4.17 B).

(A)



(B)

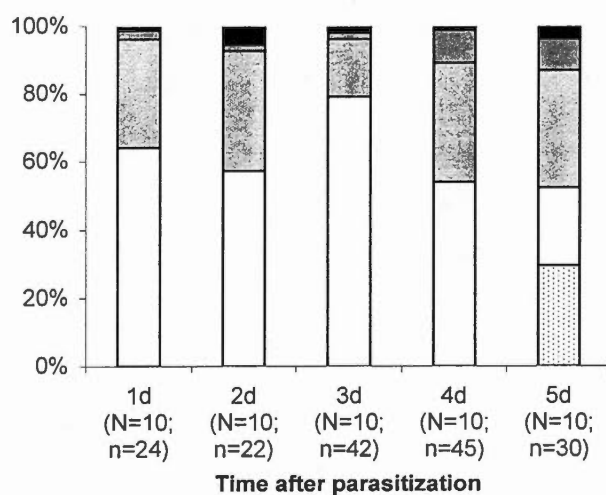


Figure 4.17: Kinetics of *D. coccinellae* egg encapsulation after (A) 6 h or (B) 24 h of contact with *H. axyridis*. (For each time: N=number of replicates; n=mean number of parasitoid eggs recovered).

DISCUSSION

Coccinellid beetles are widely used in biological control of pest insects but are themselves susceptible to natural enemies (Majerus, 1994; Hodek and Honěk, 1996). Intraguild predation and cannibalism are important factors of coccinellid population regulation (Osawa, 1993), but coccinellids can also suffer high rates of parasitism depending on the species and geographical location (Hodek and Honěk, 1996). When attacked by vertebrates, arachnids or insect predators, coccinellids escape using well described behavioural and chemical defences (Daloze et al., 1994; Majerus, 1994; Völkl 1995; Hodek and Honěk, 1996; Sloggett et al., 1998; Yasuda et al., 2001; Sato et al., 2005). In contrast, the response of the immune system of coccinellids to the presence of endoparasitoids, nematodes, protozoa and fungi has received little attention (Majerus, 1994; Hodek and Honěk, 1996). This is the first study that describes the immune cell of a Coccinellidae and their action against foreign bodies (*E. coli* bacteria, Sephadex® beads and parasitoid eggs). Earlier observations on coccinellid hemocytes were restricted to a few studies (Cali and Bridggs, 1967; Hurst et al., 1996; Karystinou et al., 2004), none of which provided ultrastructural analysis of cells using electronic and photonic microscopy.

We observed two categories of hemocytes in the hemolymph of *H. axyridis*. Four hemocyte types, GH I, GH II, Oe and PI belong to the first category and show the typical ultrastructural features described in the literature (Brehélin and Zachary, 1986; Ribeiro and Brehélin, 2006). Sph belong to the second category and show original features. GH I were the most efficient hemocytes at phagocytosis of injected bacteria in *H. axyridis*. This capacity to phagocytose bacteria has been described in most insect species studied, including Coleoptera, with the exception of Diptera (Lavine and Strand, 2002; Ribeiro and Brehélin, 2006). GH II cells seem to be responsible for nodule and capsule formation in *H. axyridis*. This function has been reported in other species of Coleoptera but is absent in the Lepidoptera and in *Drosophila* (Brehélin and Zachary, 1986; Ribeiro and Brehélin, 2006). In different insect orders (Lepidoptera and Diptera), Oe are fragile cells that lyse rapidly *in vitro*. This is probably why, in *H. axyridis*, Oe were observed in TEM but not in light microscopy. The PI described here for *H. axyridis* differ slightly from those described for the Lepidoptera (Ribeiro and Brehélin, 2006). In *H. axyridis*, the golgi apparatus of PI seemed to be much

more developed, and their phagocytic capabilities were more important than reported for Lepidoptera. We also found cells with features intermediate between PI and GH II, when observed under TEM (fig. 4.14). The presence of such intermediate cells raises the possibility that the PI cells, described here, may in fact have been GH II cells with few granules. Because TEM uses only thin cell sections, we may have missed these few granules. So, in *H. axyridis*, the question of the presence of PI remains open, and it is possible that only GH II, cells very similar to the Granular Plasmatocytes described by Ratcliffe and Rowley (1981), are present.

Spherulocytes belongs to the second category of hemocytes presenting original features specific to *H. axyridis*. Similar Sph have been previously observed in Coleoptera, Lepidoptera, Dictyoptera and Cheleutoptera (Brehélin and Zachary, 1986). In *Melolontha melolontha* (Coleoptera), their large inclusions (the spherules) are homogenous and dense to electrons with no visible structure and their RER is little developed (Devauchelle, 1971, Brehélin and Zachary, 1986). In the Lepidoptera, Sph show a very well developed RER in distended cisternae and the spherules have an internal structure. In both cases, these cells have been classified as Sph only because they exhibit very large inclusions, the spherules, that distend the cell membrane. Based on these characteristics we used the same nomenclature for the hemocytes we named Sph. The Sph of *H. axyridis* are similar to those of the Lepidoptera (well developed RER), but the internal structure of the spherules is different. In the Lepidoptera, the structure of the spherules is arranged in concentric layers or shows a crystal-like organization depending on the section (Ribeiro et al., 1996). In *H. axyridis*, there are two different types of spherules. In the first type, the structure appears as a periodic arrangement of dark and grey stripes that seem to correspond to tubules (see Results). These spherules are oval inclusions and we have shown that they appear to be identical to the numerous refringent granules observed in the plasma (and in the liquid of the reflex bleeding). In the hemolymph of *H. axyridis*, there are other large inclusions (spherules of a second type), that show an internal organization in microtubules that look exactly like the structured granules of GH I, but these spherules are much larger than the granules of GH I. Hemocytes with features of both GH I and Sph are present in hemolymph of *H. axyridis* and

we can hypothesize that Sph evolved from GH I following amplification of their secretory function.

Injection of Sephadex® beads showed that *H. axyridis* hemocytes (GH II and PI) were involved in capsule formation. This reaction corresponds to the innate encapsulation ability of *H. axyridis* adults against non-living foreign bodies and differed from what was observed with living organisms such as eggs of *D. coccinellae*. At 5 days post injection, 80% of the Sephadex® beads injected were completely encapsulated compared to 33% for parasitoid eggs laid during contact of 6 h and 3.7% in contact of 24 h. The efficiency of the host immune system can be lowered when parasitoid females inject substances during oviposition (venom or polydnavirus) that disrupt hemocyte spreading and strength of encapsulation response (Tanaka, 1987; Lavine and Beckage, 1995; Strand and Pech, 1995). In addition, parasitoid eggs increase in size before hatching; *D. coccinellae* eggs grow from $67.0 \pm 6.7 \mu\text{m}$ (n=10) at oviposition to $393.7 \pm 93.2 \mu\text{m}$ (n=10) just before hatching. This increase in size could also explain why the immune system of *H. axyridis* was less efficient against parasitoid eggs than against Sephadex® beads, the egg surface that has to be covered by hemocytes increasing rapidly during the five days before egg hatching.

The proportion of parasitoid eggs encapsulated decreased when the number of eggs increased. The quantity of eggs deposited by the parasitoid female was three times as high after a 24 h oviposition period compared to the 6 h oviposition period while the proportion of complete encapsulation five days after oviposition was ten times lower. This supports the multiple target hypothesis (Salt, 1968; Vinson, 1990) that stipulates that the immune system should experience decreasing efficiency when several parasitoid eggs are deposited (Blumberg et al., 1990; Sagarra et al., 2000). For *D. coccinellae*, superparasitism could be an advantageous behavioural strategy to counteract the host resistance in an evolutionary context (Salt, 1968; van Alphen and Visser, 1990; Vinson, 1990). While the level of superparasitism observed in our experiment was artificially induced, in nature, superparasitism by *D. coccinellae* reaches 30.5% in the indigenous host *C. maculata* and 4.8% in the exotic host *H. axyridis* (Firlej et al., 2005).

The low susceptibility of *H. axyridis* to *D. coccinellae* observed in North America since its arrival (LaMana and Miller, 1996; Hoogendoorn and Heimpel, 2002; Firlej et al., 2005) could stem from the additive effects of the behavioral defenses of *H. axyridis* during parasitoid oviposition (Firlej et al.; unpublished data), the low suitability of *H. axyridis* for larval development (Firlej et al.; unpublished data) and the action of the immune system described here. In North America, the susceptibility of *H. axyridis* to entomopathogens, nematodes and parasitoids is lower than that observed in indigenous coccinellids (Hoogendoorn and Heimpel, 2002; Cottrell and Shapiro-Ilan, 2003; Firlej et al., 2005; Shapiro-Ilan and Cottrell, 2005). This escape from indigenous natural enemies is one factor that could have promoted *H. axyridis* invasion and persistence in North America, and its dominance in the coccinellid guild. To complete this study, the effect of the immune system of the exotic host *H. axyridis* on *D. coccinellae* eggs should be compared to the effect of the immune system of the indigenous host *C. maculata*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Vaillancourt, J. Frenette, D. Thibodeau for technical assistance in rearing insects. We are grateful to J.-P. Nenon, J. Le Lannic and C. Paty-Jamoneau for help in a previous part of this study. This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to DC and a grant from the Quebec Minister of Education to AF.

REFERENCES

- Adriaens, T., Branquart, E., Maes, D., 2003. The multicoloured Asian Ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? Belg. J. Zool. 133, 195-196.
- Blumberg, D., Luck, R.F., Flanders, S.E., Teran, A.L., DeBach, P., 1990. Differences in the rates of superparasitism between two strains of *Comperiella bifasciata* (Howard) parasitizing California red scale (Homoptera: Diaspididae): an adaptation to circumvent encapsulation. Ann. Entomol. Soc. Am. 83, 591-597.
- Brehélin, M., Zachary, D., 1986. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: Brehélin M. (Ed), Immunity in Invertebrates. Springer, Berlin, pp. 36-48.
- Cali, A., Briggs, J.D., 1967. The biology and life history of *Nosema tracheophila* sp. n. (Protozoa : Cnidospora : Microsporidae) found in *Coccinella septempunctata* Linnaeus (Coleoptera : Coccinellidae). J. Invert. Pathol. 9, 515-522.
- Chapin, J.B., Brou, V.A., 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). Proc. Entomol. Soc. Wash. 93, 630-635.
- Coderre, D., Lucas E., Gagné, I., 1995. The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera : Coccinellidae) in Canada. Can. Entomol. 127, 609-611.
- Cottrell, T.E., Shapiro-Ilan, D.I., 2003. Susceptibility of a native and an exotic lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 84, 137-144.
- Dalozé, D., Braekman, J.-C., Pasteels, J.M., 1994. Ladybird defence alkaloids: Structural, chemotaxonomic and biosynthetic aspects (Col.: Coccinellidae). Chemoecology. 5, 173-183.
- Davies, D.H., Vinson, S.B., 1986. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiophiles nigriceps* of encapsulation in vitro by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role of fibrous layer in immunity. J. Insect Physiol. 32, 1003-1010.
- de Almeida, LM, da Silva, VB., 2002. First record of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): a lady beetle native to the Palearctic region. Rev. Brasil. Zool. 19, 941-944.
- Devauchelle, G., 1971. Étude ultrastructurale des hémocytes du coléoptère *Melolontha melolontha* (L.). J. Ultrastructure Res. 34, 492-516.
- Dixon, A.F.G., 2000. Insect predator-prey dynamics: Ladybird beetles and biological control. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Dreistadt, S.H., Hagen, K.S., Bezark, L.G., 1995. *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), first western United States record for this asiatic lady beetle. Pan-Pacific Entomol. 71, 135-136.
- Eslin, P., Prevost, G., 1996. Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. J. Insect Physiol. 42, 549-555.
- Eslin, P., Prevost, G., 1998. Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. J. Insect Physiol. 44, 807-816.
- Eslin, P., Prevost, G., 2000. Racing against host's immunity defenses: a likely strategy for passive evasion of encapsulation in *Asobara tabida* parasitoids. J. Insect Physiol. 46, 1161-1167.

- Firlej, A., Boivin, G., Lucas, E. & Coderre, D., 2005. First report of *Harmonia axyridis* Pallas being attacked by *Dinocampus coccinellae* Schrank in Canada. *Biol. Invasions* 7, 553-556.
- Firlej, A., Chouinard, G., & Coderre, D. 2006. A meridic diet for the rearing of *Hyaliodes vitripennis* Say (Hemiptera: Miridae), a predator of mites in apple orchards. *Biocontrol Sci. Technol.* 16, 743-751.
- Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. *Tissue Cell* 35, 243-251.
- Gupta A.P., 1991. Immunology of insects and other arthropods. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.
- Hodek, I., Honěk, A., 1996. Ecology of Coccinellidae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hoogendoorn, M., Heimpel, G.E., 2002. Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. *Biol. Control* 25, 224-230.
- Hurst, G.D., Walker, L.E., Majerus, M.E.N., 1996. Bacterial infections of hemocytes associated with the maternally inherited male-killing trait in British populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata*. *J. Invert. Pathol.* 68, 286-292.
- Karystinou, A., Thomas, A.P.M., Roy, H., 2004. Presence of haemocyte-like cells in coccinellid reflex blood. *Physiol. Entomol.* 29, 94-96.
- Kay, D., Rothschild, M., Aplin, R., 1969. Particles present in the haemolymph and defensive secretions of insects. *J. Cell Sci.* 4, 369-379.
- Keane, R.M., Crawley, M.J., 2002. Exotic plants invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17, 164-171.
- Kraaijeveld, A.R., Godfray, H.C.J., 1999. Geographic patterns in the evolution of resistance and virulence in *Drosophila* and its parasitoids. *Am. Nat.* 153, S61-S74.
- LaMana, M.L., Miller, J.C., 1996. Field observations on *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera; Coccinellidae) in Oregon. *Biol. Control* 6, 232-237.
- Lavine, M.D., Beckage N.E., 1995. Polydnviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitol. Today* 11, 368-378.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32, 1295-1309.
- Lee, K.A., Klasing, K.C., 2004. A role for immunology in invasion biology. *Trends Ecol. Evol.* 19, 523-529.
- Majerus, M.E.N., 1994. Ladybirds. New Naturalist Series 81, Harper Collins Publishers, London.
- Majerus, MEN, Roy, H.E., 2005. Scientific opportunities by the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, in Britain. *Bull. Royal Entomol. Soc.* 29, 196-208.
- Meister, M., Lagueux, M., 2003. *Drosophila* blood cells. *Cell. Microbiol.* 5, 573-580.
- Moreau, S.J.M., Eslin, P., Giordanengo, P., Doury, G., 2003. Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus *Asobara* to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*. *Develop. Comp. Immu.* 27, 273-282.
- Nalepa, C.A., Kidd, K.A., Ahlstrom, K.R., 1996. Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89, 681-685.
- Obrycki, J.J., Tauber, M.J., 1979. Seasonal synchrony of the parasite *Perilitus coccinellae* and its host *Coleomegilla maculata*. *Environ. Entomol.* 8, 400-405.

- Osawa, N., 1993. Population field studies of the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): life tables and key factor analysis. *Res. Popul. Ecol.* 35, 335-348.
- Pech, L.L., Strand, M.R., 2000. Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J. Insect Physiol.* 46, 1565-1573.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Dunn, A.M., 2004. Roles of parasites in animal invasions. *Trends Ecol. Evol.* 19, 385-390.
- Ratcliffe, N.A., Rowley A.F., 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. In: Gupta A.P. (Ed.) *Insect hemocytes development, forms, functions and techniques*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 331-414.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque staining in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- Ribeiro, C., Brehélin, M., 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 52, 417-429.
- Ribeiro, C., Simões, N., Brehélin, M., 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. In vivo and in vitro studies. *J. Insect Physiol.* 42, 815-822.
- Richards, E.H., Edwards, J.P., 2000. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, suppresses haemocyte-mediated recognition of nonself and phagocytosis. *J. Insect Physiol.* 46, 1-11.
- Richerson, J.V., DeLoach, C.J., 1973. Seasonal abundance of *Perilitus coccinellae* and its Coccinellid hosts and degree of parasitism in central Missouri. *Environ. Entomol.* 2, 138-141.
- Russo, J., Brehélin, M., Carton, Y., 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47, 167-172.
- Sagarra, L.A., Peterkin, D.D., Vincent, C., Stewart R.K., 2000. Immune response of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae), to oviposition of the parasitoid *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae). *J. Insect Physiol.* 46, 647-653.
- Sall, J., Lehman, A., 1996. *JMP start statistics: A guide to statistical and data analysis using JMP® and JMP IN® software*. Duxbury Press, Toronto.
- Salt, G., 1968. The resistance of insect parasitoids to the defense reaction of their host. *Biol. Rev.* 43, 200-232.
- Sato, S., Yasuda, H., Evans, E.W., 2005. Dropping behaviour of larvae of aphidophagous ladybirds and its effects on incidence of intraguild predation: interactions between the intraguild prey, *Adalia bipunctata* (L.) and *Coccinella septempunctata* (L.) and the intraguild predator, *Harmonia axyridis* Pallas. *Ecol. Entomol.* 30, 220-224.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23, 344-351.
- Shapiro-Ilan, D.I., Cottrell, T.E., 2005. Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 150-156.
- Sloggett, J.J., Wood, R.A., Majerus, M.E.N., 1998. Adaptations of *Coccinella magnifica* Redtenbacher, a myrmecophilous coccinellid, to aggression by wood ants (*Formica rufa* Group). I. Adult behavioral adaptation, its ecological context and evolution. *J. Insect Behav.* 11, 889-904.

- Smith, B.C., 1960. Note on parasitism of two coccinellids, *Coccinella trifasciata perplexa* Muls. and *Coleomegilla maculata lengi* Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. Can. Entomol. 92, 652.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman & company, N.Y.
- Strand, M.R., Pech, L.L., 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationship. Annu. Rev. Entomol. 40, 31-56.
- Tanaka, T., 1987. Morphological changes in haemocytes of the host, *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*. Develop. Comp. Immu. 11, 57-67.
- Tedders, W.L., Schaefer, P.W., 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the southeastern United States. Entomol. News 105, 228-243.
- Torchin, M.E., Mitchell, C.E., 2004. Parasites, pathogens and invasions by plants and animals. Front. Ecol. Environ. 2, 183-190.
- van Alphen, J.J.M., Visser, M.E., 1990. Superparasitism as an adaptative strategy for insect parasitoids. Annu. Rev. Entomol. 35, 59-79.
- Vinson, S.B., 1990. How parasitoids deal with the immune systems of their hosts: an overview. Arch. Insect Biochem. Physiol. 13, 3-27.
- Völkl, W., 1995. Behavioural and morphological adaptations of the coccinellid, *Platynaspis luteorubra* for exploiting ant-attended resources (Coleoptera: Coccinellidae). J. Insect Behav. 8, 653-670.
- Wright, E.J., Laing, J.E., 1982. Stage-specific mortality of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake on corn in southern Ontario. Environ. Entomol. 11, 32-37.
- Yasuda, H., Kikuchi, T., Kindlmann, P., Sato, S., 2001. Relationships between attack and escape rates cannibalism, and intraguild predation in larvae of two predatory ladybirds. J. Insect Behav. 14, 373-383.
- Zhao, B., Wang, M.X., 1992. Ultrastructure of the defense reaction against the larvae of *Macracanthorhynchus hirudinaeus* in laboratory-infected beetles. J. Parasitol. 78, 1098-1101.

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES

Quand une espèce exotique envahit un nouvel environnement, l'« enemy release hypothesis » (ERH) prédit que cette espèce sera peu susceptible aux ennemis naturels indigènes (Keane & Crawley 2002; Torchin et al. 2003). À mesure que le temps passe, les ennemis naturels indigènes peuvent s'adapter à cette nouvelle espèce exotique mais la diversité d'espèces s'y attaquant ne devient jamais aussi grande que dans la région d'origine (Cornell & Hawkins 1994; Torchin & Mitchell 2004). Cependant, il existe des situations où des espèces exotiques (notamment plantes exotiques) sont devenues rapidement susceptibles à des ennemis naturels indigènes (Agrawal & Kotanen 2003; Wolfe et al. 2004; Parker & Hay 2005). Ces cas de figure peu abondants, en contradiction avec l'ERH, ont amené plus de précautions quant à l'interprétation des observations et ont soulevé différents points de discussion, notamment:

- L'importance de la phylogénie : des espèces exotiques proches au niveau taxonomique des espèces indigènes offrent plus de chance de transfert d'ennemis naturels dans le nouvel environnement (Mitchell et al. 2006).

- Le statut spécialiste vs généraliste de l'ennemi naturel: les espèces exotiques seraient plus susceptibles aux ennemis naturels généralistes comparativement aux spécialistes (Joshi & Vrieling 2005).

- Une prédiction associée à l'ERH est que la diversité d'espèces attaquant une espèce exotique est plus grande dans sa région d'origine que dans sa région d'introduction (Torchin & Mitchell 2004). Cependant, comparer la diversité des espèces dans les régions d'origine et d'introduction ne tient pas compte de l'intensité de l'impact des ennemis naturels (Colautti et al. 2004).

- Enfin, peu d'études utilisent des expériences d'exclusion des ennemis naturels qui permettent de vérifier l'ERH (Callaway et al. 2004; Colautti et al. 2004).

A la suite de notre étude, peut-on conclure que *H. axyridis* représente un cas d'ERH? Un bilan de la diversité des ennemis naturels (champignons, prédateurs et parasitoïdes) attaquant *H. axyridis* est dressé au tableau D.1. La diversité des ennemis naturels de *H. axyridis* est plus grande dans la zone d'introduction (Amérique du Nord) que

dans la zone d'origine (Asie). Mais comme énoncé précédemment, la diversité ne tient pas compte de l'intensité de l'impact de chaque espèce, lequel demeure relativement peu documenté en Asie. Également, les espèces exotiques et leurs ennemis sont souvent mieux étudiés dans la région d'introduction que dans la région d'origine, ce qui introduit un biais en défaveur de la diversité des ennemis naturels présents dans la zone d'origine (Mitchell & Power 2003; Torchin et al. 2003). C'est le cas de la relation entre *H. axyridis* et d'autres prédateurs Coccinellidae, laquelle a été largement étudiée en Amérique du Nord depuis les cinq dernières années.

Depuis l'établissement de *H. axyridis* en Amérique du Nord en 1988 et en Europe en 2000, le nombre de publications sur cette espèce a grimpé (fig. D.1). Pourtant, seulement quatre articles portent sur l'impact des ennemis naturels (parasitoïdes uniquement) sur les populations de *H. axyridis* en nature en Asie (Maeta 1969; Osawa 1992; Osawa 1993; Park et al. 1996), ce qui semble confirmer le manque de données sur cette espèce exotique dans sa région d'origine. Par contre, il est documenté que *H. axyridis* est moins susceptible aux ennemis naturels en Amérique du Nord que les coccinelles indigènes (voir État des connaissances). Cette caractéristique pourrait conférer à *H. axyridis* un avantage vis-à-vis des espèces indigènes en permettant un investissement plus grand sur le plan de la survie et la reproduction. Afin d'évaluer correctement si *H. axyridis* se conforme à l'ERH, une étude comparative de l'effet des ennemis naturels dans les régions d'origine et d'introduction serait nécessaire (Torchin & Mitchell 2004).

Tableau D.1 : Diversité des ennemis naturels attaquant *H. axyridis* dans les régions d'origine (Japon, Chine, ex-URSS) et d'introduction (Amérique du Nord).

Espèces	Type	Région d'origine	Région d'introduction
<i>Coccinella septempunctata</i> brucki	Prédateur	x	
<i>Cycloned sanguinea</i> (L.)	Prédateur		x
<i>Hippodamia convergens</i> Guérin-Méneville	Prédateur	x	x
<i>Coccinella transversogutatta</i> Brown	Prédateur	x	x
<i>Coleomegilla maculata</i> lengi Timberlake	Prédateur		x
<i>Podisus maculiventris</i> Say	Prédateur		x
<i>Strongygaster triangulifera</i> (Loew)	Parasitoïde		x
<i>Phalacrotophora</i> sp.	Parasitoïde	x	x
<i>Medina</i> sp.	Parasitoïde	x	
<i>Degeeria luctuosa</i> Meig.	Parasitoïde	x	
<i>Tetrastichus</i> sp.	Parasitoïde	x	
<i>Dinocampus coccinellae</i> Schrank	Parasitoïde	x	x
<i>Beauveria bassiana</i>	Champignon		x
<i>Hesperomyces virescens</i> Thaxter	Champignon		x
Total		7	10

Source: Maeta 1969; Osawa 1992; Osawa 1993; Hough-Goldstein et al. 1996; Disney 1997; Cottrell & Yeargan 1998; Katsoyannos & Aliniaze 1998; Yasuda et al. 2001; Hoogendoorn & Heimpel 2002; Michaud 2002; Nalepa & Kidd 2002; Cottrell & Shapiro-Ilan 2003; Snyder et al. 2004; Yasuda et al. 2004; Riddick & Schaefer 2005; Shapiro-Ilan & Cottrell 2005.

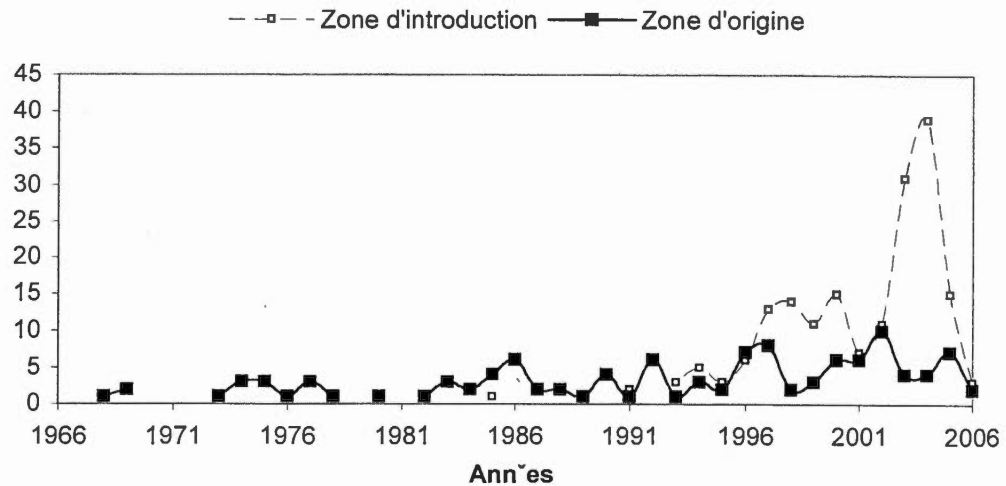


Figure D.1 : Nombre d'articles scientifiques publiés sur les populations de *H. axyridis* présentes dans les régions d'origine (Japon, Chine, ex-URSS) et d'introduction (Amérique du Nord, du Sud et Europe).

Il est important de ne pas oublier que l'ERH n'est pas la seule raison pouvant expliquer le succès d'invasion de *H. axyridis* en Amérique du Nord. D'autres caractéristiques de *H. axyridis* ou de l'environnement permettent d'expliquer sa performance dans son nouvel environnement (Colautti et al. 2004). Parmi les facteurs ayant pu influencer le succès d'invasion de *H. axyridis* en Amérique du Nord notons ses caractéristiques de développement (fécondité, temps de développement...) (Iablokoff-Khnzorian 1982; Labrie et al. 2006) et de comportement (voracité, prédation intragilde) (Cottrell & Yeargan 1998; Michaud 2002; Koch 2003; Snyder et al. 2004; Yasuda et al. 2004), les caractéristiques du nouveau milieu comme les conditions abiotiques (température, humidité...) et la ressource (type et abondance des proies) qui jouent un rôle dans l'établissement d'espèces exotiques dans un nouvel environnement (Boivin et al. 2006) mais qui restent inexplorées pour *H. axyridis*. Enfin, la quantité d'individus introduits influence beaucoup le succès d'invasion (Kolar & Lodge 2001; Allendorf & Lundquist 2003; Ehrlich 2003). Les introductions massives de *H. axyridis* de 1978 à 1981 (87 810 individus) (Teddars & Schaefer 1994) ont certainement favorisé son établissement en Amérique du Nord. Le succès d'invasion de cette

coccinelle est donc une intégration de différentes caractéristiques du milieu d'introduction et de ses attributs biologiques, ce que notre étude vient ici appuyer.

À travers cette thèse, les taux de parasitisme totaux et les taux de parasitisme à succès observés dans les chapitres 1 et 3 diffèrent entre eux en lien avec le type de traitement que les coccinelles ont subi. Dans le chapitre 1, les coccinelles ont été parasitées en nature sans contrôle sur la fréquence de piqûre des parasitoïdes femelles tandis que le chapitre 3 présente des taux de parasitisme résultant d'une seule piqûre par une femelle parasitoïde. Les conditions optimales associées aux expériences en Pétri du chapitre 3 ont favorisé un taux de parasitisme plus élevé comparativement au chapitre 1 étant donné l'absence de possibilité d'échappement des coccinelles au parasitoïde dans le Pétri. Les taux de parasitisme à succès diffèrent aussi entre les chapitres 1 et 3 étant donné le nombre d'immatures parasitoïdes présents dans les hôtes. Dans le chapitre 1, certaines coccinelles parasitées contenaient plusieurs immatures de parasitoïde ayant pu affaiblir les coccinelles et diminuer leur qualité nutritive interne, favorisant ainsi un faible succès parasitaire. Dans le chapitre 3, les coccinelles parasitées une seule fois et donc moins affaiblies, présentaient certainement une meilleure qualité nutritive interne pour le parasitoïde expliquant ainsi les hauts taux de réussite parasitaire.

Les aspects comportementaux et physiologiques de l'interaction entre l'hôte exotique, *H. axyridis*, et le parasitoïde, *D. coccinellae*, n'avaient jamais été étudiés auparavant même si ces deux espèces sont présentes en Amérique du Nord et en Asie (voir l'état des connaissances). Notre étude a donc permis de mettre en évidence que le parasitoïde est confronté à plusieurs barrières afin de parasiter efficacement cette coccinelle : les comportements de défense de l'hôte (chapitre 2), le système immunitaire (chapitre 4) et la qualité de l'hôte (chapitre 3). Au final, le parasitisme en nature chez cette espèce hôte reste plutôt faible (chapitre 1). Ce sont les effets cumulatifs de toutes ces barrières qui nous conduisent à conclure que le parasitoïde *D. coccinellae* n'est pas adapté à parasiter l'hôte exotique *H. axyridis*. Nos conclusions sont basées sur l'intégration de trois niveaux d'étude; cependant d'autres niveaux pourraient jouer un rôle, entre autre le comportement d'hivernation de *H. axyridis* et les barrières temporelles et spatiales.

Parmi les caractéristiques comportementales de la coccinelle asiatique pouvant influencer le parasitisme par *D. coccinellae*, il y aurait **le comportement d'hivernation**. En Amérique du Nord, la coccinelle asiatique passe l'hiver dans les maisons ou immeubles urbains, aussi bien dans le Nord au Québec que dans le sud des États-Unis (Nalepa et al. 2000; Schaefer 2003; Huelsman & Kovack 2004; Nalepa et al. 2005). Ce comportement est complètement différent des autres espèces de coccinelles comme la coccinelle maculée qui passe l'hiver à l'extérieur, enfouie en groupe sous la neige et les feuilles (Jean et al. 1990). La stratégie comportementale adoptée par une espèce pour hiverner va être influencée par sa capacité de résistance au froid, laquelle est évaluée en mesurant le point de surfusion. La température optimale en hiver pour la survie de *H. axyridis* au Japon est entre 0 et -5°C avec 90% de survie hivernale (Watanabe 2002). Au Connecticut (McClure 1987), la survie est de 10% à l'extérieur alors que les températures minimales peuvent atteindre -30°C. La survie hivernale de *H. axyridis* dans les régions plus au nord de l'Amérique du Nord va donc dépendre de la qualité du site d'hivernation que les individus auront trouvé pour se protéger contre les froids hivernaux (Koch et al. 2004b). Si *D. coccinellae* réussit à parasiter des *H. axyridis* à la fin de l'été (par exemple des larves), la probabilité que les individus parasités survivent est faible si les adultes *H. axyridis* hivernent à l'extérieur sous des températures froides. Si les adultes *H. axyridis* hivernent dans les maisons, alors la survie des individus parasités est inconnue et resterait donc à explorer afin de déterminer l'effet de l'hivernation dans les maisons sur la survie hivernale de *D. coccinellae*.

Même si *H. axyridis* arrive plus tardivement dans les cultures que d'autres coccinelles (Yasuda & Shinya 1997; Musser & Shelton 2003; Nault & Kennedy 2003), il existe des chevauchements temporels et spatiaux entre les populations de *H. axyridis* et *C. maculata*. Les populations de *H. axyridis* peuvent devenir très importantes à partir du mois d'août (Musser & Shelton 2003). Les coccinelles sont particulièrement abondantes dans les champs de maïs durant l'été (Koch 2003; Musser & Shelton 2003; Nault & Kennedy 2003; Lundgren et al. 2004) où le parasitisme par *D. coccinellae* a été observé fréquemment sur les coccinelles indigènes (Richerson & DeLoach 1973; Parker et al. 1977; Cartwright et al. 1982; Hoogendoorn & Heimpel 2002). Pour rappel, le parasitisme par *D. coccinellae* sur *H. axyridis* est de 4.6% et sur *C. maculata* de 32% en moyenne durant l'été dans les champs de

mais et de luzerne au Québec (chapitre 1). Cependant, aucune étude n'a pour l'instant mis en relation les dynamiques des populations du trio *H. axyridis*-*D. coccinellae*-*C. maculata*. En effet, les interactions du parasitoïde avec les hôtes en nature sont peu connues. Quelques auteurs ont observé des fluctuations de taux de parasitisme par *D. coccinellae* durant la saison (Parker et al. 1977; Cartwright et al. 1982) et en relation avec les populations de *C. maculata* (Wright & Laing 1982). Connaître les chevauchements temporels et spatiaux entre le parasitoïde et les deux espèces hôtes permettrait de déterminer s'il existe **une barrière temporelle ou spatiale au parasitisme** de *H. axyridis* par *D. coccinellae*. Par exemple, dans les cultures de maïs, *H. axyridis* se trouve préférentiellement dans les parties hautes de la plante tandis que les *C. maculata* se trouvent préférentiellement dans les parties basses (Musser & Shelton 2003). Les processus de sélection de l'habitat et de localisation de l'hôte sur un plant sont inconnus chez *D. coccinellae*. Les seules données existantes concernent la reconnaissance des hôtes à proximité (Richerson & DeLoach 1972). Une telle étude permettrait de vérifier si la niche spatio-temporelle de *H. axyridis* lui assure un « enemy free space » par rapport à *D. coccinellae*.

La description du système immunitaire de *H. axyridis* ainsi que de son implication dans la relation *H. axyridis*-*D. coccinellae* ont été présentées au chapitre 4. Cependant, la **comparaison de l'incidence du système immunitaire de l'espèce hôte exotique et de l'espèce hôte native sur le parasitoïde** reste à étudier. En effet, rien n'est connu du système immunitaire de *C. maculata* et de son importance dans la relation avec *D. coccinellae*. Est-ce que la réponse immunitaire pourrait expliquer la susceptibilité plus faible de *H. axyridis* au parasitisme de *D. coccinellae* comparativement à *C. maculata*? Par exemple, il a été démontré que deux trématodes parasites indigènes échappaient plus facilement au système immunitaire de leur hôte indigène qu'à celui du nouvel hôte exotique récemment établi, avec lequel ils n'ont pas coévolué (Rigaud & Moret 2003). Le système immunitaire des espèces invasives pourrait donc jouer un rôle dans leur succès d'invasion (Lee & Klasing 2004), mais ce domaine reste peu étudié. Également, l'investissement dans la résistance aux parasitoïdes implique un compromis avec les caractéristiques biologiques telles que la compétitivité larvaire (Green et al. 2000), la taille des adultes produits, la fécondité des femelles (Fellowes et al. 1999) ou le taux de croissance de la population (Hoang 2002) chez les drosophiles. Il

serait pertinent de déterminer le coût de la défense de *H. axyridis* contre le parasitoïde *D. coccinellae* en terme de croissance larvaire, fécondité, voracité ou compétitivité avec les autres coccinelles, même si *D. coccinellae* ne parasite pas efficacement la coccinelle exotique.

Un élément pouvant affecter l'adéquation de l'hôte pour le parasitoïde est sa composition en **alcaloïdes**. En effet, les coccinelles aposématiques produisent des molécules azotées appelées alcaloïdes qui sont sécrétées avec l'hémolymphe dans le réflexe de saignement « reflex bleeding » (Pasteels et al. 1973; Hodek et Honěk 1996). Ces alcaloïdes ont été bien identifiés chez plusieurs coccinelles : l'alcaloïde provoquant la mauvaise odeur est la pyrazine et ceux provoquant la toxicité varient d'une espèce à l'autre. Chez *C. maculata*, l'alcaloïde toxique connu est la précoccinelline (Henson et al. 1975) alors que chez *H. axyridis* c'est l'harmonine et le 3-hydroxypiperidin-2-one (Alam et al. 2002). Ces molécules sont des composés défensifs très efficaces contre les ennemis naturels ; certains insectes phytophages les séquestrent à défaut de les produire eux-mêmes, ce qui leur confère alors une protection contre la prédation (Eisner et al. 2000; Nishida 2002). La toxicité des alcaloïdes contre les parasitoïdes a été observée, par exemple dans le cas du papillon *Utetheisa ornatrix* (Linnaeus) chez lequel des alcaloïdes séquestrés des plantes par la larve durant son alimentation sont conservés durant la vie adulte ; les mâles transfèrent ces alcaloïdes lors de l'accouplement via le spermatophore et la femelle les transfère aux œufs. Les œufs contenant des alcaloïdes sont alors protégés contre le parasitoïde *Trichogramma ostrinae* (Peng & Chen) (Bezzarides et al. 2004). L'influence des différents types d'alcaloïdes selon les espèces de coccinelles n'a jamais été étudiée dans le cas du parasitoïde *D. coccinellae*. Cette étude permettrait de déterminer s'il existe une corrélation entre le spectre d'hôtes de *D. coccinellae* et les classes d'alcaloïdes de chaque espèce.

Comme démontré au chapitre 3, le patron de croissance des tératocytes (augmentation de la taille et diminution du nombre) peut être utilisé comme indice de la qualité interne d'un hôte. La qualité d'un hôte est souvent évaluée par la mesure de différentes variables, dont le temps de développement, la survie, les taux d'encapsulation, etc. (Vinson & Iwantsch 1980; Mochiah et al. 2001; Chinwada et al. 2003; Mohamed et al. 2003;

Wiedenmann et al. 2003; Urbaneja & Stansly 2004). Utiliser le patron de croissance des tératocytes pour évaluer l'adéquation d'un hôte à un parasitoïde et tenter d'expliquer le spectre d'hôtes du parasitoïde par ce paramètre n'a jamais été réalisé. Dans les cas de nouvelles associations hôte - parasitoïde, de précédentes études ont révélées des patrons de croissance des tératocytes bien différents de ceux qui ont été observés pour des associations ayant coévolué; le nombre de tératocytes étant moins élevé dans les espèces hôtes « nouvelles » dès l'éclosion de l'œuf et durant le développement de la larve de parasitoïde (Alleyne et al. 2001; Barratt & Sutherland 2001). On pourrait donc s'attendre à ce que le patron de croissance des tératocytes varie en fonction du niveau d'adaptation du parasitoïde à ces hôtes. Mettre en relation les taux de parasitisme observés en nature chez les espèces hôtes avec le patron de croissance des tératocytes ainsi qu'avec des données sur la valeur adaptative de la progéniture permettrait de mieux comprendre l'adaptation du parasitoïde aux espèces hôtes dans l'optique d'expliquer son spectre d'hôtes.

Quelques questions...

Peut-on prédire l'évolution de la relation *H. axyridis* – *D. coccinellae*?

Dans une étude sur la compétition apparente, Hoogendoorn & Heimpel (2002) prédisent, sur la base d'un modèle de simulation (Heimpel et al. 2003), que l'invasion de *H. axyridis* aura un effet positif sur l'équilibre des densités de *C. maculata* et *D. coccinellae*. Une fraction de la population de *C. maculata* échappe toujours au parasitisme de *D. coccinellae*, mais une fraction des œufs de *D. coccinellae* pondus dans *H. axyridis* serait perdue selon l'hypothèse du puit d'œufs (« egg sink »). Selon leur simulation, *H. axyridis* souffrirait un peu de l'augmentation de parasitoïdes (a) présents dans la population (b) mais les densités de ses populations atteindraient un équilibre assez élevé après 20 générations (fig. D.2).

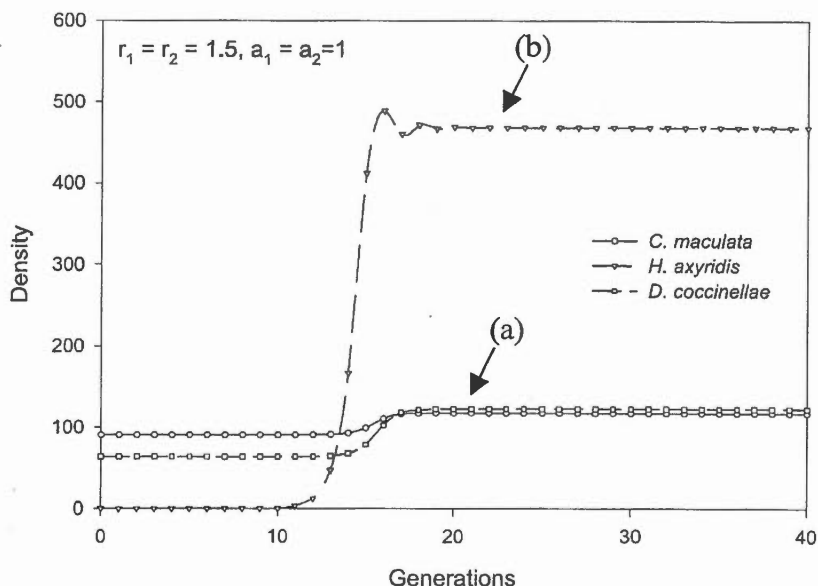


Figure D.2 : Modèle de simulation sur les densités de *C. maculata*, *H. axyridis* et *D. coccinellae* à leur densité d'équilibre (tiré de Hoogendoorn & Heimpel 2002) (r_1 et r_2 représentent les taux d'accroissement des populations de *C. maculata* et *H. axyridis* respectivement et a_1 et a_2 les taux d'attaque de *D. coccinellae* sur *C. maculata* et *H. axyridis* respectivement).

Est-ce que nos résultats pourraient modifier ce modèle? *Dinocampus coccinellae* est un parasitoïde généraliste à large spectre d'hôtes (Hodek & Honěk 1996) et qui utilise différents hôtes selon l'abondance de chacun au fil de la saison. La sélection de l'hôte chez *D. coccinellae* est influencée par des caractéristiques telles que la taille, le stade, la couleur ou la mobilité (voir État des connaissances). Même si les larves de *H. axyridis* permettent un meilleur succès de développement pour le parasitoïde que les adultes (chapitre 3), il reste que ce stade est moins attaqué que les adultes en situation de choix (chapitre 2), conformément à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature pour d'autres espèces (Obrycki et al. 1985; Geogheghan et al. 1998). Nous avons observé que *D. coccinellae* rencontre plus fréquemment *H. axyridis* que *C. maculata*. Sur ces individus rencontrés, les taux d'attaque des femelles *D. coccinellae* envers les adultes *H. axyridis* sont aussi élevés que sur *C. maculata* (chapitre 2), mais les adultes de *H. axyridis* sont inadéquats pour le développement des œufs du parasitoïde à cause des défenses immunitaires (chapitre 3 & 4). Ceci vient

renforcer l'idée de Hoogendoorn & Heimpel (2002) selon laquelle les adultes *H. axyridis* représentent un puit d'œufs pour *D. coccinellae*. Ce modèle tient compte des taux d'attaque, de la susceptibilité des hôtes au parasitoïde et des pourcentages de parasitisme observé dans les champs. Cependant, la présence d'encapsulation, laquelle ne peut être vérifiée sans dissection fine (chapitre 4), pourrait représenter un facteur affectant les niveaux des populations de *D. coccinellae* et qui ne sont pas intégrés dans le modèle de Hoogendoorn & Heimpel (2002). En effet, le paramètre pris en compte pour représenter l'adéquation des deux espèces hôtes est basé sur le nombre de parasitoïdes immatures observés après dissection dans les hôtes et ne tient pas compte du nombre réel d'œufs pondus. Également, le temps perdu à manipuler les adultes *H. axyridis* (chapitre 2) a possiblement un effet sur la fréquence de rencontres des *C. maculata* et donc sur le taux d'attaque sur une séquence complète. Si bien que les paramètres taux d'attaques a_1 et a_2 fixés à 1 pour les deux espèces par Hoogendoorn & Heimpel (2002) dévient certainement de la réalité: le taux d'attaque de l'espèce *C. maculata* étant probablement sur estimé.

Lutte biologique contre *H. axyridis*?

Malgré la grande capacité de prédation de *H. axyridis* et ses effets bénéfiques sur les populations de ravageurs, cette espèce est souvent considérée comme nuisible. En effet, comme abordé précédemment, les adultes *H. axyridis* hivernent dans les maisons (Kidd et al. 1995; Huelman & Kovack 2004), dans les vignobles, ils se nourrissent de raisins endommagés et se retrouvent dans les pressoirs ce qui a pour effet de contaminer le goût du vin (Pickering et al. 2004); ils se nourrissent de manière opportuniste sur les fruits d'automne (Kock et al. 2004a; Kovach 2004); et ils ont des effets négatifs sur la faune indigène (Brown & Miller 1998; Cottrell & Yeagan 1998; Phoololo & Obrycki 1998; Michaud 2002; Brown 2003; Koch et al. 2003; Snyder et al. 2004; Koch et al. 2005). Cette espèce a été déclarée récemment ravageur potentiel des productions fruitières dans le Midwest américain (Majerus et al. 2006). Se demander s'il faut contrôler les populations de cette espèce exotique nous amène devant un dilemme. En effet, les perturbations engendrées par cette coccinelle (hivernation, contamination du vin et consommation de fruits) pourraient justifier la prise de mesures pour gérer ses populations, alors que les effets positifs associés à son établissement (contrôle biologique des ravageurs) suggèrent plutôt des pratiques de conservation et de

favorisation des populations. Les études d'évaluation de risque qui ont été mises de l'avant depuis le boom des invasions biologiques devraient normalement permettre d'éclairer la prise de décision face à cette problématique. Actuellement, seule une étude d'évaluation de risques associés à l'invasion de *H. axyridis* a été réalisée, et elle porte sur les effets non ciblés sur les populations de papillon Monarque (Koch et al. 2006). Cette seule étude s'avère insuffisante, et vient appuyer l'idée généralement acceptée que plus d'évaluations des risques associés à *H. axyridis* seront nécessaires (Koch 2003; Koch et al. 2006; Majerus et al. 2006).

Afin de régler le problème du mécontentement du public à l'encontre de cette coccinelle au moment des migrations automnale et printanière, le développement de techniques de capture ou de répulsion est encore la voie la plus prometteuse, étant donné l'absence de régulation possible, pour le moment, par les ennemis naturels indigènes (notamment *D. coccinellae*), pas encore adaptés à cette espèce, et le risque sur la santé humaine associé à l'utilisation de pesticides en milieu résidentiel. Actuellement, deux équipes de recherche étudient les effets de produits répulsifs naturels ou à faible incidence sur la santé humaine contre ces coccinelles (Riddick et al. 2000; Riddick et al. 2004) ainsi que les stimuli et comportements impliqués dans le choix des sites d'hivernation (Nalepa et al. 1996; Nalepa et al. 2000; Nalepa et al. 2005). Les résultats de ces recherches fourniront peut-être des pistes de solution diminuer certains effets négatifs associés à l'invasion de cette espèce.

En conclusion, l'étude, à différentes échelles, de la relation *H. axyridis*-*D. coccinellae* a permis de mieux comprendre les relations entre une espèce hôte exotique, établie depuis peu dans un nouvel environnement, et un parasitoïde indigène. Nous avons pu démontrer qu'il n'existe pas qu'une seule mais plusieurs barrières au parasitisme de *H. axyridis* par *D. coccinellae*. Cette étude est d'autant plus intéressante que ces deux espèces ont un grand potentiel d'interaction en Amérique du Nord et en Europe, suite à l'invasion de la coccinelle asiatique sur ces deux continents. Également, nos résultats abordent l'aspect mécanistique d'une nouvelle relation espèce exotique - espèce indigène. Actuellement, les études empiriques sur les invasions biologiques se limitent souvent à observer la faible susceptibilité des espèces exotiques aux ennemis naturels indigènes et explorent peu les mécanismes écologiques, nutritionnels, comportementaux ou physiologiques qui en sont à

l'origine. Étudier les nouvelles interactions peu de temps après l'établissement d'une espèce exotique est une opportunité à saisir et pose les premiers jalons permettant d'observer et de mieux suivre l'évolution de ces nouvelles interactions. Tout ceci dans une optique de mieux prédire ou de contrôler les effets des espèces exotiques sur leur nouvel environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Adriaens T., Branquart E. & Maes D. 2003. The multicoloured Asian Ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? Belg. J. Zool. 133: 195-196.
- Agrawal A.A. & Kotanen P.M. 2003. Herbivores and the success of exotic plants: a phylogenetically controlled experiment. Ecol. Lett. 6: 712-715.
- Al Abassi S., Birkett M.A., Pettersson J., Pickett J.A., Wadhams L.J. & Woodcock C.M. 2001. Response of the ladybird parasitoid *Dinocampus coccinellae* to toxic alkaloids from the seven-spot ladybird, *Coccinella septempunctata*. J. Chem. Ecol. 27: 33-43.
- Alam N., Choi I.S., Song K.-S., Hong J., Lee C.O. & Hung J.H. 2002. A new alkaloid from two coccinellids beetles *Harmonia axyridis* and *Aiolocaria hexaspilota*. Bull. Korean Chem. Soc. 23: 497-499.
- Aliabadi B.W. & Juliano S.A. 2002. Escape from gregarine parasites affects the competitive interactions of an invasive mosquito. Biol. Invasions 4: 283-297.
- Allen G.R. 1990. Influence of host behavior and host size on the success of oviposition of *Cotesia urabae* and *Dolichogenidea eucalypti* (Hymenoptera: Braconidae). J. Insect Behav. 3: 733-750.
- Allendorf F.W. & Lundquist L.L. 2003. Introduction; Population biology, evolution and control of invasive species. Conserv. Biol. 17: 24-30.
- Alleyne M., Wiedenmann R.N. & Diaz R.R. 2001. Quantification and development of teratocytes in novel-association host-parasitoid combinations. J. Insect Physiol. 47: 1419-1427.
- Alyokhin A. & Sewell G. 2004. Changes in a lady beetle community following the establishment of three alien species. Biol. Invasions 6: 463-471.
- Baldur W.V. 1926. The bionomics of *Dinocampus coccinellae* Schrank. Ann. Entomol. Soc. Am. 19: 465-498.
- Barratt B.I.P. & Sutherland M. 2001. Development of teratocytes associated with *Microctonus aethiopoides* Loan (Hymenoptera: Braconidae) in natural and novel host species. J. Insect Physiol. 47: 257-262.
- Barrows E.M. 2001. Animal Behaviour Desk Reference: A Dictionary of Animal Behaviour, Ecology, and Evolution. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Barzman M.S. & Daane K.M. 2001. Host-handling behaviours in parasitoids of the black scale: a case for ant-mediated evolution. J. Anim. Ecol. 70: 237-247.
- Berti-Filho E. & Costa V.A. 1995. *Perilitus coccinellae* (Schrank, 1802) (Hymenoptera, Braconidae, Euphorinae), a parasitoid of *Coleomegilla maculata* (DeGeer) (Coleoptera, Coccinellidae). Rev. Agric. Piracicaba 70: 80.
- Bezzarides A., Yong T.-H., Bezzarides J., Hussein J., Ladau J., Eisner M. & Eisner T. 2004. Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinae*). Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 9029-9032.
- Blumberg D., Luck R.F., Flanders S.E., Teran A.L. & DeBach P. 1990. Differences in the rates of superparasitism between two strains of *Comperiella bifasciata* (Howard) parasitizing California red scale (Homoptera: Diaspididae): an adaptation to circumvent encapsulation. Ann. Entomol. Soc. Am. 83: 591-597.
- Boivin G., Kölliker-Ott U.M., Bale J. & Bigler F. 2006. Assessing the establishment potential of inundative biological control agents, pp 98-113. Dans Bigler F., Babendreier D. & Kuhlmann U. (Eds), Environmental Impact of Invertebrates for Biological Control of Arthropods: Methods and Risk Assessment. CABI Publishing.

- Boulétreau M. 1988. Parasitisme et génétique dans le monde des Insectes. *Pour la Science* 123: 78-87.
- Braendle C. & Weisser W.W. 2001. Variation in escape behavior of red and green clones of the pea aphid. *J. Insect Behav.* 14: 497-509.
- Brehélin M. & Zachary D. 1986. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy, pp. 36-48. Dans Brehélin M. (Ed.), *Immunity in Invertebrates*. Springer, Berlin.
- Brown M.W. 2003. Intraguild predation responses of aphid predators on apple to the invasion of an exotic species, *Harmonia axyridis*. *Biocontrol* 48: 141-153.
- Brown M.W. & Miller S.S. 1998. Coccinellidae (Coleoptera) in apple orchards of eastern west Virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. *Entomol. News*. 109: 143-151.
- Burgio G., Santi F. & Maini S. 2002. On intra-guild predation and cannibalism in *Harmonia axyridis* (Pallas) and *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Control* 24: 110-116.
- Cali A. & Briggs J.D. 1967. The biology and life history of *Nosema tracheophila* sp. n. (Protozoa : Cnidospora : Microsporidae) found in *Coccinella septempunctata* Linnaeus (Coleoptera : Coccinellidae). *J. Invert. Pathol.* 9: 515-522.
- Callaway R.M., Thelen G.C., Rodrigue, A. & Holben W.E. 2004. Soil biota and exotic plant invasion. *Nature* 427: 731-733.
- Carl K.P. 1982. Biological control of native pests by introduced natural enemies. *Biocontrol News Inf.* 3: 191-200.
- Carruthers R.I. & Onsager J.A. 1993. Perspective on the use of exotic natural enemies for biological control of pest grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Environ. Entomol.* 22: 885-903.
- Carton Y. & Nappi A. 1991. The *Drosophila* immune reaction and the parasitoid capacity to evade it: genetic and coevolutionary aspects. *Acta Oecol.* 12: 89-104.
- Carton Y. & Sokolowski M.B. 1992. Interactions between searching strategies of *Drosophila* parasitoids and the polymorphic behavior of their hosts. *J. Insect Behav.* 5: 161-175.
- Cartwright B., Eikenbary R.D. & Angalet G.W. 1982. Parasitism by *Perilitus coccinellae* (Hym.: Braconidae) of indigenous coccinellid hosts and the introduced *Coccinella septempunctata* (Col.: Coccinellidae), with notes on winter mortality. *Entomophaga* 27: 237-244.
- Castner J.L. 1984. Suitability of *Scapteriscus* spp. Mole crickets (Ort.: Gryllotalpidae) as hosts of *Larra bicolor* (Hym.: Sphecidae). *Entomophaga* 29: 323-329.
- Chapin J.B. & Brou V.A. 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). *Proc. Entomol. Soc. Washington* 93: 630-635.
- Chau A. & Mackauer M. 1997. Dropping of pea aphids from feeding site: Consequence of parasitism by the wasp, *Monoctonus paulensis*. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 247-252.
- Chau A. & Mackauer M. 2001. Preference of the aphid parasitoid *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Baconidae, Aphidiinae) for different aphid species. Femal choice and offspring survival. *Biol. Control* 20: 30-38.
- Chinwada P., Overholt W.A., Omwega C.O. & Muekec J.M. 2003. Geographic differences in host acceptance and suitability of two *Cotesia sesamiae* populations in Zimbabwe. *Biol. Control* 28: 354-359.

- Coderre D. & Tourneur J.-C. 1988. Déclin estival des populations aphidiennes du maïs. *Rev. Entomol. Quebec* 32: 16-24.
- Coderre D., Lucas E. & Gagné I. 1995. The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera : Coccinellidae) in Canada. *Can. Entomol.* 127: 609-611.
- Colautti R.I., Ricciardi A., Grigorovich I.A. & MacIsaac H.J. 2004. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecol. Letters* 7: 721-733.
- Colunga-Garcia M. & Cage S.H. 1998. Arrival, establishment, and habitat use of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) in a Michigan landscape. *Environ. Entomol.* 27: 1574-1580.
- Collins M.D. & Dixon A.F.G. 1986. The effect of egg depletion on the foraging behaviour of an aphid parasitoid. *J. Appl. Entomol.* 102: 342-352.
- Conrad M.S. 1959. The spotted lady beetle, *Coleomegilla maculata* (DeGeer), as a predator of European corn borer eggs. *J. Econ. Entomol.* 52: 843-847.
- Cornell H.V. & Hawkins B.A. 1994. Patterns of parasitoid accumulation on introduced herbivores, pp 77-89. Dans Hawkins B.A. & Sheenan W. (Eds.) *Parasitoid Community Ecology*. Oxford University Press, New York, USA.
- Cornell J.C., Stamp N.E. & Bowers M.D. 1987. Developmental change in aggregation, defense and escape behaviour of buckmoth caterpillars, *Hemileuca lucina* (Saturniidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20: 383-388.
- Cottrell T.E. 2004. Suitability of exotic and native lady beetle eggs (Coleoptera: Coccinellidae) for development of lady beetle larvae. *Biol. Control* 31: 362-371.
- Cottrell T.E. & Shapiro-Ilan D.I. 2003. Susceptibility of a native and an exotic lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Pathol.* 84: 137-144.
- Cottrell T.E. & Yeargan K.V. 1998. Intraguild predation between an introduced lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), and a native lady beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 71: 159-163.
- Crawley M.J. 1989. Chance and timing in biological invasions, pp 407-423. Dans Drake J.A., Mooney H.A., di Castri F., Groves R.H., Kruger F.J., Rejmánek M. & Williamson M. (Eds) *Biological invasions: a global perspective*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Dahlman D.L. 1990. Evaluation of teratocyte functions: an overview. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 13: 159-166.
- Dahlman D.L. & Vinson S.B. 1993. Teratocytes: Developmental and biochemical characteristics, pp. 145-165. Dans Beckage N.E., Thompson S.N. & Federici B.A. (Eds.), *Parasites and pathogens of insects, Volume 1: Parasites*. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Daloze D., Braekman J.-C. & Pasteels J.M. 1994. Ladybird defence alkaloids: Structural, chemotaxonomic and biosynthetic aspects (Col.: Coccinellidae). *Chemoecol.* 5: 173-183.
- David P. & Samadi S. 2000. *La théorie de l'évolution, une logique pour la biologie*. Flammarion, Paris, France.
- Davies D.H. & Vinson S.B. 1986. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation in vitro by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. *J. Insect Physiol.* 32: 1003-1010.
- Davis D., Stewart S.L., Manica A. & Majerus M.E.N. 2006. Adaptive preferential selection of female coccinellid hosts by the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Eur. J. Entomol.* 103: 41-45.

- Day E.D., Prokrym W.H., Ellis D.R. & Chianese R.J. 1994. The known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in eastern North America. *Entomol. News* 105: 244-256.
- de Almeida L.M. & da Silva V.B. 2002. First record of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): a lady beetle native to the Palearctic region. *Rev. Bras. Zool.* 19: 941-944.
- De Buron I. & Beckage N.E. 1997. Developmental changes in teratocytes of the Braconid wasp *Cotesia congregata* in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 43: 915-930.
- Devauchelle G. 1971. Étude ultrastructurale des hémocytes du coléoptère *Melolontha melolontha* (L.). *J. Ultrastructure Res.* 34: 492-516.
- Dill L.M., Fraser A.H.G. & Roitberg B.D. 1990. The economics of escape behaviour in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Oecologia* 83: 473-478.
- Disney R.H.L. 1997. A new species of Phoridae (Diptera) that parasites a wide-spread Asian ladybird beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *The Entomologist* 116: 163-168.
- Dixon A.F.G. 2000. Ladybirds as predators. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume Uni.
- Doucet D. & Cusson M. 1996. Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumifera* larvae parasitized by *Tranisema rostrale*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114A: 311-317.
- Doutt R.L. 1959. The biology of parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 4: 161-182.
- Drake J.M. 2003. The paradox of the parasites: implications for biological invasions. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 270: S133-S135.
- Dreistadt S.H., Hagen K.S. & Bezark L.G. 1995. *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), first western United States record for this asiatic lady beetle. *Pan-Pacific Entomol.* 71: 135-136.
- Dupas S., Brehelin M., Frey F. & Carton Y. 1996. Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. *Parasitology* 113: 207-212.
- Ehler L.E. 1998. Invasion biology and biological control. *Biol. Control* 13: 127-133.
- Ehrlich P.R. 2003. Attributes of invaders and the invading processes: vertebrates, pp: 315-328. Dans Drake J.A. & Mooney H.A. (Eds), *Biological Invasions: A global perspective*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Eilenberg J., Hajek A. & Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- Eisner T., Eisner M., Rossini C., Iyengar V.K., Roach B.L., Benedikt E. & Meinwald J. 2000. Chemical defense against predation in an insect egg. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 1634-1639.
- Eslin P., Giordanengo P., Fourdrain Y. & Prevost G. 1996. Avoidance of encapsulation in the absence of VLP by a braconid parasitoid of *Drosophila* larvae: an ultrastructural study. *Can. J. Zool.* 74: 2193-2198.
- Eslin P. & Prevost G. 1996. Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. *J. Insect Physiol.* 42: 549-555.

- Eslin P. & Prevost G. 1998. Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J. Insect Physiol.* 44: 807-816.
- Falk-Petersen J., Bøhn T. & Sandlund O.T. 2006. On the numerous concepts in invasion biology. *Biol. Invasions* 8: 1409-1424.
- Farias A.M.I. de & Hopper K.R. 1999. Oviposition behavior of *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Aphidius matricariae* (Hymenoptera: Aphidiidae) and defense behavior of their host *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 28: 858-862.
- Félix S. & Soares A.O. 2004. Intraguild predation between the aphidophagous ladybird beetles *Harmonia axyridis* and *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the role of body weight. *Eur. J. Entomol.* 101: 237-242.
- Fellowes M.D.E., Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C.J. 1999. The relative fitness of *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) that have successfully defended themselves against the parasitoid *Asobara tabida* (Hymenoptera, Braconidae). *J. Evol. Biol.* 12: 123-128.
- Fellowes M.D.E., Masnatta P., Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C.J. 1998. Pupal parasitoid attack influences the relative fitness of *Drosophila* that have encapsulated larval parasitoids. *Ecol. Entomol.* 23: 281-284.
- Firlej A., Boivin G., Lucas E. & Coderre D. 2005. First report of *Harmonia axyridis* Pallas being attacked by *Dinocampus coccinellae* Schrank in Canada. *Biol. Invasions* 7: 553-556.
- Firlej A., Chouinard G. & Coderre D. 2006. Selection and optimization of a meridic diet for the rearing of *Hyaliodes vitripennis* Say (Hemiptera: Miridae), a predatory of mites in apple orchard. *Biocontrol Sci. Technol.* 16: 743-751.
- Futuyma D.J. 1998. *Evolutionary biology*, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, USA.
- Gagné I. 1996. Optimisation des températures d'élevage de masse et d'entreposage de *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera: coccinellidae). Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada.
- Gentry G.L. & Dyer L.A. 2002. On the conditional nature of neotropical caterpillar defenses against their natural enemies. *Ecology* 83: 3108-3119.
- Geoghegan I.E., Majerus T.M.O. & Majerus M.E.N. 1998. Differential parasitisation of adult and pre-imaginal *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) by *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Eur. J. Entomol.* 95: 571-579.
- Gerling D., Roitberg B.D. & Mackauer M. 1990. Instar-specific defense of the pea-aphid, *Acyrtosiphon pisum*: influence on oviposition success of the parasite *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *J. Insect Behav.* 3: 501-514.
- Giles K.L., Obrycki J.J. & DeGooyer T.A. 1994. Prevalence of predators associated with *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) and *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) during growth of the first crop of alfalfa. *Biol. Control* 4: 170-177.
- Giulianini P.G., Bertolo F., Battistella S. & Amirante G.A. 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. *Tissue Cell* 35: 243-251.
- Godfray H.C.J. 1994. *Parasitoids: behavioural and evolutionary ecology*. Princeton University Press, Princeton, Royaume Uni.

- Gopalapillai R., Kadono-Okuda K. & Okuda T. 2005. Molecular cloning and analysis of a novel teratocyte-specific carboxylesterase from the parasitic wasp, *Dinocampus coccinellae*. *Insect Bioch. Molec. Biol.* 35: 1171-1180.
- Gordon R.D. 1985. The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. J. N. Y. Entomol. Soc. 93: 1-912.
- Green D.M., Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C.J. 2000. Evolutionary interactions between *Drosophila melanogaster* and its parasitoid *Asobara tabida*. *Heredity* 85: 450-458.
- Groden E., Drummond F.A., Cassagrande R.A. & Haynes D.L. 1990. *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae): its predation upon the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) and its incidence in potatoes and surrounding crops. *J. Econ. Entomol.* 83: 1306-1315.
- Gross P. 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 251-273.
- Gupta A.P. 1986a. Hemocytic and humoral immunity in Arthropods. John Wiley & Sons Inc, New York, NJ.
- Gupta A.P. 1986b. Arthropod immunocytes: Identification, structure, functions, and analogies to the functions of vertebrate B- and T-Lymphocytes. Dans Gupta A.P. (Ed.), Hemocytic and humoral immunity in Arthropods. John Wiley & Sons Inc, New York, NJ.
- Gupta A.P. 1991. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral, pp. 19-118. Dans Gupta A.P. (Ed.), Immunology of insects and other arthropods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl.
- Gurevitch J. & Padilla D.K. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends Ecol. Evol.* 19: 470-474.
- Hall R.W., Ehler L.E. & Bisabri-Ershadi B. 1980. Rate of success in classical biological control of arthropods. *Ibid* 26: 111-14.
- Heimpel G.E., Neuhauser C. & Hoogendoorn M. 2003. Effects of parasitoid fecundity and host resistance on indirect interactions among hosts sharing a parasitoid. *Ecol. Lett.* 6: 556-566.
- Heinrich B. 1979. Foraging strategies of caterpillars. *Oecologia* 42: 325-337.
- Henry L.M., Gillespie D.R. & Roitberg B.D. 2005. Does mother really know best? Oviposition preference reduces reproductive performance in the generalist parasitoid *Aphidius ervi*. *Entomol. Exp. Appl.* 116: 167-174.
- Henson R.D., Thompson A.C., Hedin P.A., Nichols P.R. & Neel W.W. 1975. Identification of precoccinellin in the ladybird beetle *Coleomegilla maculata*. *Experientia* 31: 145.
- Henter H.J. 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system. II. Genetic variation within a population of wasps in the ability to parasitize an aphid host. *Evolution* 49: 439-445.
- Henter H.J. & Via S. 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system. I. Genetic variation within an aphid population in susceptibility to a parasitic wasp. *Evolution* 49: 427-438.
- Hoang A. 2002. Physiological consequences of immune response by *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) against the parasitoid *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Evol. Biol.* 15: 537-543.
- Hochberg M.E. & Holt R.D. 1995. Refuge evolution and the population dynamics of coupled host-parasitoid associations. *Evol. Ecol.* 9: 633-661.
- Hodek I. 1973. Biology of Coccinellidae. Academia Press. Prague.

- Hodek I. & Honěk A. 1996. Ecology of Coccinellidae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hokkanen H.M.T. & Pimentel D. 1989 New associations in biological control: theory and practice. Can. Entomol. 121: 829-840.
- Hoogendoorn M. & Heimpel G.E. 2002. Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. Biol. Control 25: 224-230.
- Hoogendoorn M. & Heimpel G.E. 2004. Competitive interactions between an exotic and a native ladybeetle: a field cage study. Entomol. Exp. Appl. 111: 19-28.
- Hotta M., Okuda T. & Tanaka T. 2001. *Cotesia kariyai* teratocytes: growth and development. J. Insect Physiol. 47: 31-41.
- Hough-Goldstein J., Cox J. & Armstrong A. 1996. *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae) predation on ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). Fl. Entomol. 79: 64-68.
- Howarth F.G. 1991 Environmental impacts of classical biological control. Annu. Rev. Entomol. 36: 485-509.
- Hsiao T.H., Holdaway F.G. & Chiang H.C. 1966. Ecological and physiological adaptation in insect parasitism. Entomol. Exp. Appl. 9: 113-123.
- Hudon M. 1959. First record of *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae) as a parasite of *Coccinella novemnotata* Hbst. and *Coleomegilla maculata lengi* Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Canada. Can. Entomol. 91: 63-64.
- Huelsman M.F. & Kovack J. 2004. Behavior and treatment of the multicolored Asian lady beetle (*Harmonia axyridis*) in the urban environment. Fl. Entomol. 50: 163-164.
- Hufbauer R.A. 2002. Evidence for nonadaptive evolution in parasitoid virulence following a biological control introduction. Ecol. Appl. 12: 66-78.
- Hufbauer R.A. & Roderick G.K. 2005. Microevolution in biological control: Mechanisms, patterns, and processes. Biol. Control 35: 227-239.
- Hukushima S. & Kamei M. 1970. Effects of various species of aphids as food on development, fecundity and longevity of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). Res. Bull. Fac. Agric. Gifu Univ. 29: 53-66.
- Hurst G.D., Walker L.E. & Majerus M.E.N. 1996. Bacterial infections of hemocytes associated with the maternally inherited male-killing trait in British populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata*. J. Invert. Pathol. 68: 286-292.
- Iablokoff-Khnzorian S.M. 1982. Les coccinelles; Coleoptères-Coccinellidae, tribu Coccinellides régions paléarctique et orientale. Paris: Société nouvelles des éditions Boubée.
- Iperti G. & Bertrand E. 2001. Hibernation of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in South-Eastern France. Acta Soc. Zool. Bohem. 65: 207-210.
- Iwasa Y., Suzuki Y. & Matsuda H. 1984. Theory of oviposition strategy of parasitoids. I. Effect of mortality and limited egg number. Theor. Popul. Biol. 26: 205-227.
- Jean C., Coderre D. & Tourneur J.-C. 1990. Effects of temperature and substrate on the survival and lipid consumption of hibernating *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera; Coccinellidae). Environ. Entomol. 19: 1657-1662.
- Joshi J. & Vrieling K. 2005. The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. Ecol. Lett. 8: 704-714.

- Kadono-Okuda K., Weyda F. & Okuda T. 1998. *Dinocampus* (= *Perilitus*) *coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. *J. Insect Physiol.* 44: 1073-1080.
- Kadono-Okuda K., Sakurai H., Takeda S. & Okuda T. 1995. Synchronous growth of a parasitoid, *Perilitus coccinellae*, and teratocytes with the development of the host, *Coccinella septempunctata*. *Entomol. Exp. Appl.* 75: 145-149.
- Karamaouna F. & Copland M.J.W. 2000. Host suitability, quality and host size preference of *Leptomastix epona* and *Pseudaphycus flavidulus*, two endoparasitoids of the mealybug *Pseudococcus viburni*, and host size effect on parasitoid sex ratio and clutch size. *Entomol. Exp. Appl.* 96: 149-158.
- Karystinou A., Thomas A.P.M. & Roy H. 2004. Presence of haemocyte-like cells in coccinellid reflex blood. *Physiol. Entomol.* 29: 94-96.
- Katsoyannos P. & Aliniaze M.T. 1998. First record of *Strongygaster triangulifera* (Loew) (Diptera: Tachinidae) as a parasitoid of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in western North America. *Can. Entomol.* 130: 905-906.
- Katsoyannos P., Kontodimas D.C., Stathas G.J. & Tsartsalis C.T. 1997. Establishment of *Harmonia axyridis* on citrus and some data on its phenology in Greece. *Phytoparasitica* 25: 183-191.
- Kay D., Rothschild M. & Aplin R. 1969. Particles present in the haemolymph and defensive secretions of insects. *J. Cell Sci.* 4: 369-379.
- Keane R.M. & Crawley M.J. 2002. Exotic plants invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17: 164-171.
- Kidd K.A., Nalepa C.A., Day E.R. & Waldvogel M.G. 1995. Distribution of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in North Carolina and Virginia. *Proc. Entomol. Soc. Washington* 97: 729-731.
- Kieckhefer R.W. & Elliot N.C. 1990. A 13-year survey of the aphidophagous Coccinellidae in maize fields in eastern South Dakota. *Can. Entomol.* 122: 579-581.
- Kimberling D.N. 2004. Lessons from history: predicting successes and risks of intentional introductions for arthropod biological control. *Biol. Invasions* 6: 301-318.
- Koch R.L. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.* 3: 1-16.
- Koch R.L., Venette R.C. & Hutchinson W.D. 2005. Influence of alternate prey on predation of Monarch butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae) larva by the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ. Entomol.* 34: 410-416.
- Koch R.L., Venette R.C. & Hutchinson W.D. 2006. Predicted impact of an exotic generalist predator on monarch butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae) populations: a quantitative risk assessment. *Biol. Invasions* 8: 1179-1193.
- Koch R.L., Burkness E.C., Burkness S.J.W. & Hutchinson W.D. 2004a. Phytophagous preferences of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) for autumn-ripening fruit. *J. Econ. Entomol.* 97: 539-544.
- Koch R.L., Carrillo M.A., Venette R.C., Cannon C.A. & Hutchinson W.D. 2004b. Cold hardiness of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ. Entomol.* 33: 815-822.
- Koch R.L., Hutchinson W.D., Venette R.C. & Heimpel G.E. 2003. Susceptibility of immature monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae), to predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Control* 28: 265-270.

- Kolar C.S. & Lodge D.M. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.* 16: 199-204.
- Kouamé K.L. & Mackauer M. 1991. Influence of aphid size, age and behaviour on host choice by the parasitoid wasp *Ephedrus californicus*: A test of host-size models. *Oecologia* 88: 197-203.
- Kovack J. 2004. Impact of multicolored Asian lady beetles as a pest of fruit and people. *Fl. Entomol.* 50: 159-161.
- Kovar I. 1996. Phylogeny, pp 19-31. Dans Hodek I. & Honěk A. (Eds.), *Ecology of Coccinellidae*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Kraaijeveld A.R. & Godfray H.C.J. 1999. Geographic patterns in the evolution of resistance and virulence in *Drosophila* and its parasitoids. *Am. Nat.* 153: S61-S74.
- Kraaijeveld A.R. & van Alphen J.J.M. 1994. Geographical variation in resistance of the parasitoid *Asobara tabida* against encapsulation by *Drosophila melanogaster* larvae: the mechanism explored. *Physiol. Entomol.* 19: 9-14.
- Kraaijeveld A.R., Hutcheson K.A., Limentani E.C. & Godfray H.C.J. 2001. Costs of counterdefenses to host resistance in a parasitoid of *Drosophila*. *Evolution* 55: 1815-1821.
- Krafsur E.S. & Obrycki J.J. 2000. *Coleomegila maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) is a species complex. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 1156-1163.
- Krakau M., Thieltges D.W. & Reise K. 2006. Native parasites adopt introduced bivalves of the North Sea. *Biol. Invasions* 8: 919-925.
- Labrie G., Lucas É. & Coderre D. 2006. Can developmental and behavioral characteristics of the multicolored asian lady beetle *Harmonia axyridis* explain its invasive success? *Biol. Invasions* 8: 743-754.
- LaMana M.L. & Miller J.C. 1996. Field observations on *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera; Coccinellidae) in Oregon. *Biol. Control* 6: 232-237.
- Lavine M.D. & Beckage N.E. 1995. Polydnviruses: Potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitol. Today* 11: 368-378.
- Lavine M.D. & Strand M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 1295-1309.
- Lederhouse R.C. 1990. Avoiding the hunt: primary defenses of Lepidopteran caterpillars, pp. 175-189. Dans Evans D.L. & Schmidt J.O. (Eds.), *Insect Defenses: Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. State University of New York Press. New York.
- Lee C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol. Evol.* 17: 386-391.
- Lee K.A. & Klasing K.C. 2004. A role for immunology in invasion biology. *Trends Ecol. Evol.* 19: 523-529.
- Lewis W.J., Vet L.E.M., Tumlinson J.H., van Lenteren J.C. & Papaj D.R. 1990. Variations in parasitoid foraging behaviour: Essentiel element of a sound biological controp theory. *Environ. Entomol.* 19: 1183-1193.
- Li S., Falabella P., Giannantonio S., Fanti P., Battaglia D., Digilio M.C., Völkl W., Sloggett J.J., Weisser W. & Pennacchio F. 2002. Pea aphid clonal resistance to the endophagous parasitoid *Aphidius ervi*. *J. Insect Physiol.* 48: 971-980.
- Lockwood J.A. 1993 Environmental issues involved in biological control of rangeland grasshoppers (Orthoptera: acrididae) with exotic agents. *Environ. Entomol.* 22: 503-518.
- Lockwood J.A. 1996. The ethics of biological control: understanding the moral implications of our most powerful ecological technology. *Agric. Human Values* 13: 2-19.

- Losey, J.E. & Denno R.F. 1998. The escape response of the pea aphids to foliar-foraging predators: factor affecting dropping behaviour. *Ecol. Entomol.* 23: 53-61.
- Lundgren J.G., Razzak A.A. & Wiedenmann R.N. 2004. Population responses and food consumption by predators *Coleomegilla maculata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) during anthesis in an Illinois cornfield. *Environ. Entomol.* 33: 958-963.
- Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M., Evans H., Clout M. & Bazzaz F.A. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology global consequences, and control. *Ecol. Appl.* 10: 689-710.
- Mackauer M., Michaud J.P. & Völkl W. 1996. Host choice by aphidiid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): host recognition, host quality, and host value. *Can. Entomol.* 128: 959-980.
- Maeta Y. 1969. Biological studies on the natural enemies of some Coccinellid beetles. I. On *Perilitus coccinellae* (Schrank). *Kontyû* 37: 147-166.
- Majerus M., Strawson V. & Roy H. 2006. The potential impacts of the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), in Britain. *Ecol. Entomol.* 31: 207-215.
- Majerus M.E.N. 1994. Ladybirds. Harper Collins Publishers, London UK.
- Majerus M.E.N. 1997. Parasitization of British ladybirds by *Dinocampus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae). *Br. J. Ent. Nat. Hist.* 10: 15-24.
- Majerus M.E.N. & Roy H.E. 2005. Scientific opportunities by the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, in Britain. *Antenna* 29: 196-208.
- Majerus M.E.N., Geoghegan I.E. & Majerus T.M.O. 2000. Adaptive preferential selection of young coccinellid hosts by the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Eur. J. Entomol.* 97: 161-164.
- Mangel M. 1989. Evolution of host selection in parasitoids: Does the state of the parasitoid matter? *Amer. Nat.* 133: 688-705.
- Mansfield S. & Mills N.J. 2004. A comparison of methodologies for the assessment of host preference of the gregarious egg parasitoid *Trichogramma platneri*. *Biol. Control* 29: 332-340.
- Mauricio R. & Bowers M.D. 1990. Do caterpillars disperse their damage?: larval foraging behaviour of two specialist herbivores, *Euphydryas phaeton* (Nymphalidae) and *Pieris rapae* (Pieridae). *Ecol. Entomol.* 15: 153-161.
- McClure M.S. 1987. Potential of the asian predator *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), to control *Matsucoccus resinosae* Bean and Godwin (Homoptera: Margarodidae) in the United States. *Environ. Entomol.* 16: 224-230.
- Meister M. & Lagueux M. 2003. *Drosophila* blood cells. *Cell. Microbiol.* 5: 573-580.
- Michaud J.P. 2002. Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. *Environ. Entomol.* 31: 827-835.
- Mitchell C.E. & Power A.G. 2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* 421: 625-627
- Mitchell C.E., Agrawal A.A., Bever J.D., Gilbert G.S., Hufbauer R.A., Klironomos J.N., Maron J.L., Morris W.F., Parker I.M., Power A.G., Seabloom E.W., Torchin M.E. & Vázquez D.P. 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecol. Lett.* 9: 726-740.
- Mochiah M.B., Ngi-Song A.J., Overholt W.A. & Botchey M. 2001. Host suitability of four cereal stem borers (Lepidoptera: Crambidae, Noctuidae) for different geographic

- populations of *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. *Biol. Control* 21: 285-292.
- Mohamed S.A., Overholt W.A., Wharton R.A., Lux S.A. & Eltoun E.M. 2003. Host specificity of *Psytalia cosyrae* (Hymenoptera: Braconidae) and the effect of different host species on parasitoid fitness. *Biol. Control* 28: 155-163.
- Mooney H.A. & Cleland E.E. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 5446-5451.
- Moreau S.J.M., Eslin P., Giordanengo P. & Doury G. 2003. Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus *Asobara* to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*. *Develop. Comp. Immu.* 27: 273-282.
- Müller C.B. & Schmid-Hempel R. 1992. To die for host or parasite? *Anim. Behav.* 44: 177-179.
- Musser F.R. & Shelton A.M. 2003. Factors altering the temporal and within-plant distribution of coccinellids in corn and their impact on potential intra-guild predation. *Environ. Entomol.* 32: 575-583.
- Myers J.H. & Smith J.N.M. 1978. Head flicking by tent caterpillars : a defensive response to parasite sounds. *Can. J. Zool.* 56: 1628-1631.
- Nakamatsu Y., Fudii S. & Tanaka T. 2002. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *J. Insect Physiol.* 48: 1041-1052.
- Nalepa C.A. & Kidd K.A. 2002. Parasitism of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) by *Strongygaster triangulifera* (Diptera: Tachinidae) in north Carolina. *J. Entomol. Sci.* 37: 124-127.
- Nalepa C.A., Kennedy G.G. & Brownie C. 2005. Role of visual contrast in the alighting of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) at overwintering sites. *Environ. Entomol.* 34: 425-431.
- Nalepa C.A., Kidd K.A. & Ahlstrom K.R. 1996. Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89: 681-685.
- Nalepa C.A., Kidd K.A. & Hopkins D.I. 2000. The multicoloured Asian ladybeetle (Coleoptera: Coccinellidae): orientation to aggregation sites. *J. Entomol. Sci.* 35: 150-157.
- Nakamatsu Y., Fujii S. & Tanaka T. 2002. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *J. Insect Physiol.* 48: 1041-1052.
- Nault B.A. & Kennedy G.G. 2003. Establishment of multicolored Asian lady beetle in Eastern North Carolina: seasonal abundance and crop exploitation within an agricultural landscape. *Biocontrol* 48: 363-378.
- Nishida R. 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 57-92.
- Nutting W.L. & H.G. Spangler. 1969. The hastate setae of certain dermestid larvae: a entangling defense mechanism. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 62: 763-769.
- Obyrcki J.J. 1989. Parasitization of native and exotic coccinellids by *Dinocampus coccinellae* (Schränk) (Hymenoptera: Braconidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* 62: 211-218.
- Obyrcki J.J. & Tauber M.J. 1978. Thermal requirements for development of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) and its parasite *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *Can. Entomol.* 110: 407-412.

- Obrycki J.J. & Tauber M.J. 1979. Seasonal synchrony of the parasite *Perilitus coccinellae* and its host *Coleomegilla maculata*. Environ. Entomol. 8: 400-405.
- Obrycki J.J., Tauber M.J. & Tauber C.A. 1985. *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae): Parasitization and development in relation to host-stage attacked. Ann. Entomol. Soc. Am. 78: 852-854.
- Okuda T. & Ceryngier P. 2000. Host discrimination in *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae), a solitary parasitoid of coccinellids beetles. Appl. Entomol. Zool. 35: 535-539.
- Okuda T. & Kadono-Okuda K. 1995. *Perilitus coccinellae* teratocyte polypeptide: evidence for production of a teratocyte-specific 540 kDa protein. J. Insect Physiol. 41: 819-825.
- Orr C.J., Obrycki J.J. & Flanders R.V. 1992. Host-acceptance behavior of *Dinocampus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 85: 722-730.
- Osawa N. 1992. Effect of pupation site on pupal cannibalism and parasitism in the ladybird beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: coccinellidae). Jpn. J. Entomol. 60:131-135.
- Osawa N. 1993. Population field studies of the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): life tables and key factor analysis. Res. Popul. Ecol. 35: 335-348.
- Park H.C., Park Y.C., Hong O.K. & Cho S.Y. 1996. Parasitoids of the aphidophagous ladybeetles, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in Chuncheon areas, Korea. Korean J. Entomol. 26: 143-147.
- Parker J.D. & Hay M.E. 2005. Biotic resistance to plant invasions? Native herbivores prefer non-native plants. Ecol. Lett. 8: 959-967.
- Parker B.L., Whalon M.E. & Warshaw M. 1977. Respiration and parasitism in *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 70: 984-987.
- Pasteels J.M., Deroe C., Tursch B., Braekman J.C., Daloze D. & Hootele C. 1973. Distribution et activités des alcaloïdes défensifs des Coccinellidae. J. Insect Physiol. 19: 1771-1784.
- Pearson D.E. & Callaway R.M. 2003. Indirect effects of hosts-specific biological control agents. Trends Ecol. Evol. 18: 456-461.
- Pech L.L. & Strand M.R. 2000. Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. J. Insect Physiol. 46: 1565-1573.
- Pennacchio F., Vinson S.B. & Tremblay E. 1994. Regulation of *Heliothis virescens* (F.) development and hormonal metabolism by the endophagous parasitoid *Cardiochiles nigriceps* Viereck: the role of teratocytes. Norw. J. Agri. Sc. Supp. 16: 293-300.
- Pennacchio F., Vinson S.B., Tremblay E. & Ostuni A. 1994. Alteration of ecdysone metabolism in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae induced by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) teratocytes. Insect Biochem. Molec. Biol. 24: 383-394.
- Phoofolo M.W. & Obrycki J.J. 1998. Potential for intraguild predation and competition among predatory Coccinellidae and Chrysopidae. Entomol. Exp. Appl. 89: 47-55.
- Pickering G., Lin J., Riesen R., Reynolds A., Brindle I. & Soleas G. 2004. Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. Am. J. Enol. Vitic. 55: 153-159.
- Pimentel D. 1963 Introducing parasites and predators to control native pests. Can. Entomol. 95: 785-792.

- Pimentel D., Zuniga R. & Morrison D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Economics* 52: 273-288.
- Pimentel D., Lach L., Zuniga R. & Morrison D. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *Bioscience* 50: 53-65.
- Potting R.P.J., Vermeulen N.E. & Conlong D.E. 1999. Active defence of herbivorous hosts against parasitism: adult parasitoid mortality risk involved in attacking a concealed stem-boring host. *Entomol. Exp. Appl.* 91: 143-148.
- Prenter J., MacNeil C., Dick J.T.A. & Dunn A.M. 2004. Roles of parasites in animal invasions. *Trends Ecol. Evol.* 19: 385-390.
- Price P.W. 1984. *Insect ecology*. John Wiley & Sons., N.Y.
- Putman W.M.L. 1964. Occurrence and food of some coccinellids (Coleoptera) in Ontario peach orchards. *Can. Entomol.* 96: 1149-1155.
- Rana R.L., Dahlman D.L. & Webb B.A. 2002. Expression and characterization of a novel teratocyte protein of the braconid, *Microplitis croceipes* (Cresson). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 1507-1516.
- Ratcliffe N.A. & Rowley A.F. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents, pp. 331-414. In: Gupta A.P. (Ed.) *Insect hemocytes development, forms, functions and techniques*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque staining in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- Ribeiro C. & Brehélin M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 52: 417-429.
- Ribeiro C., Simões N. & Brehélin M. 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. In vivo and in vitro studies. *J. Insect Physiol.* 42: 815-822.
- Richards E.H. & Edwards J.P., 2000. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, suppresses haemocyte-mediated recognition of nonself and phagocytosis. *J. Insect Physiol.* 46: 1-11.
- Richardson D.M., Pyek P., Rejmnek M., Barbour M.G., Panetta F.D. & West C.J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Div. Distrib.* 6: 93-107.
- Richerson J.V. & DeLoach C.J. 1972. Some aspects of host selection by *Perilitus coccinellae*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 834-839.
- Richerson J.V. & DeLoach C.J. 1973. Seasonal abundance of *Perilitus coccinellae* and its Coccinellid hosts and degree of parasitism in central Missouri. *Environ. Entomol.* 2: 138-141.
- Riddick E.W. & Schaefer P.W. 2005. Occurrence, density, and distribution of parasitic fungus *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) on multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 615-624.
- Riddick E.W., Aldrich J.R. & Davis J.C. 2004. DEET repels *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) adults in laboratory bioassays. *J. Entomol. Sci.* 39: 373-386.
- Riddick E.W., Aldrich J.R., De Milo A. & Davis J.C. 2000. Potential for modifying the behavior of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) with plant-derived natural products. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 1314-1321.

- Rigaud T. & Moret Y. 2003. Differential phenoloxidase activity between native and invasive gammarids infected by local acanthocephalans: differential immunosuppression? *Parasitology* 127: 571-577.
- Rivero A. 2000. The relationship between host selection behaviour and offspring fitness in a koinobiont parasitoid. *Ecol. Entomol.* 25: 467-472.
- Rosenheim J.A. & Rosen D. 1991. Foraging and oviposition decisions in the parasitoid *Aphytis lingnanensis*: distinguish the influence of egg load and experience. *J. Anim. Ecol.* 60: 873-894.
- Ruberson J.R. & Kring D.J. 1993. Parasitism of developing eggs by *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): host age preference and suitability. *Biol. Control* 3: 39-46.
- Russo J., Brehélin M. & Carton Y. 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47: 167-172.
- Sabrosky C.W. & Braun B.H. 1970. A tachinid parasite of fireflies (Diptera: Tachinidae; Coleoptera: Lampyridae) *Entomol. News* 81: 185-187.
- Sagarra L.A., Peterkin D.D., Vincent C. & Stewart R.K. 2000. Immune response of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae), to oviposition of the parasitoid *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae). *J. Insect Physiol.* 46: 647-653.
- Sakai A.K., Allendorf F.W., Holt J.S., Lodge D.M., Molofsky J., With K.A., Baughman S., Cabin R.J., Cohen J.E., Ellstrand N.C., McCauley D.E., O'Neil P., Parker I.M., Thompson J.N. & Weller S.G. 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32: 305-332.
- Salt G. 1968. The resistance of insect parasitoids to the defence reactions of their hosts. *Biol. Rev.* 43: 200.
- Sall J. & Lehman A. 1996. *JMP Start Statistics: A Guide to Statistical and Data Analysis using JMP® and JMP IN® Software*. Duxbury Press, Toronto.
- Sato S., Yasuda H. & Evans E.W. 2005. Dropping behaviours of larvae of aphidophagous ladybirds and its effects on incidence of intraguild predation; interactions between the intraguild prey, *Adalia bipunctata* (L.) and *Coccinella septempunctata* (L.), and the intraguild predator, *Harmonia axyridis* Pallas. *Ecol. Entomol.* 30: 220-224.
- Schaefer P.W. 2003. Winter aggregation of *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae) in a concrete observation tower. *Entomol. News* 114: 23-28.
- Scherrer B. 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin éditeur, Chicoutimi.
- Schlaepfer M.A., Sherman P.W., Blossey B. & Runge M.C. 2005. Introduced species as evolutionary traps. *Ecol. Letters* 8: 241-246.
- Schmidt O., Theopold U. & Strand M. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23: 344-351.
- Shahadi F., El-Bouhssini M. & Babi A. 2002. First record of parasitoids on the predator seven spotted coccinellid, *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) in Syria. *Arab J. Plant Protec.* 20: 49-51.
- Shapiro-Ilan D.I. & Cottrell T.E. 2005. Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 89: 150-156.
- Shaw M.R. 1988. Euphorine phylogeny: the evolution of diversity in host utilization by parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Ecol. Entomol.* 13: 323-335.

- Shea K. & Chesson P. 2002. Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends Ecol. Evol.* 17: 170-177.
- Simberloff D. & Stiling P. 1996. Risks of species introduced for biological control. *Biol. Conserv.* 78: 185-192.
- Singer M.S. & Stireman J.O. 2003. Does anti-parasitoid defense explain host-plant selection by a polyphagous caterpillar? *Oikos* 100: 554-562.
- Sloggett J.J., Webberley K.M. & Majerus M.E.N. 2004. Low parasitoid success on a myrmecophilous host is maintained in the absence of ants. *Ecol. Entomol.* 29: 123-127.
- Sluss R.R. 1968. Behavioral and anatomical responses of the convergent lady beetle to parasitism by *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae). *J. Invert. Pathol.* 10: 9-27.
- Sluss R.R. & Leutenegger R. 1968. The fine structure of the trophic cells of *Perilitus coccinellae* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Ultrastructure Res.* 25: 441-451.
- Smith B.C. 1960. Note on parasitism of two coccinellids, *Coccinella trifasciata* perplexa Muls. and *Coleomegilla maculata lengi* Timb. (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. *Can. Entomol.* 92: 652.
- Smith B.C. 1961. Results of rearing some coccinellid (Coleoptera: Coccinellidae) larvae on various pollen. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 91: 270-271.
- Snyder W.E., Clevenger G.M. & Eigenbrode S.D. 2004. Intraguild predation and successful invasion by introduced ladybird beetles. *Oecologia* 140: 559-565.
- Söderhäll K. & Smith V.J. 1986. Prophenoloxylase-activating cascade as a recognition and defense system in Arthropods, pp 250-285. Dans Gupta A.P. (Ed.), *Hemocytic and humoral immunity in arthropods*. John Wiley & Sons Inc, New York, NJ.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J. 1981. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. WH Freeman and company, New York, NY.
- Stamp N.E. 1982. Behavioral interactions of parasitoids and Baltimore checkerspot caterpillars (*Euphydryas phaeton*). *Environ. Entomol.* 11: 100-104.
- Stiling P. 2003. Biological control not on target. *Biol. Invasions* 6: 151-159.
- Strand M.R., Meola S.M. & Vinson S.B. 1986. Correlating pathological symptoms in *Heliotis virescens* eggs with development of the parasitoid *Telenomus heliothidis*. *J. Insect Physiol.* 32: 389-402.
- Strand M.R. & Pech L.L. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationship. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 31-56.
- Strand M.R., Quarles J.M., Meola S.M. & Vinson S.B. 1985. Cultivation of teratocytes of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 21: 361-367.
- Strand M.R. & Wong E.A. 1991. The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol.* 37: 503-515.
- Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H. & Lewontin R.C. 1991. Introduction à l'analyse génétique. De Boeck Université, Bruxelles, Belgique.
- Tanaka T. 1987. Morphological changes in haemocytes of the host, *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*. *Develop. Comp. Immu.* 11: 57-67.
- Tedders W.L. & Schaefer P.W. 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the southern United States. *Entomol. News.* 105: 228-243.
- Thompson J.N. 1982. *Interaction and Coevolution*. John Wiley & Sons, New York, NJ. 179 p

- Toepfer S. & Kuhlmann U. 2004. Survey for natural enemies of the invasive alien chrysomelid, *Diabrotica virgifera virgifera*, in Central Europe. *Biocontrol* 49: 385-395.
- Torchin M.E. & Mitchell C.E. 2004. Parasites, pathogens and invasions by plants and animals. *Front. Ecol. Environ.* 2: 183-190.
- Torchin M.E., Lafferty K.D. & Kuris A.M. 2002. Parasites and marine invasions. *Parasitology* 124: S137-S151.
- Torchin M.E., Lafferty K.D., Dobson A.P., McKenzie V.J. & Kuris A.M. 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature* 421: 628-630.
- Ueno T. 1999. Host-feeding and acceptance by a parasitic wasp (Hymenoptera: Ichneumonidae) as influenced by egg load and experience in a patch. *Evol. Ecol.* 13: 33-44.
- Urbaneja A. & Stansly P.A. 2004. Host suitability of different instars of the whitefly *Bemisia tabaci* 'biotype Q' for *Eretmocerus mundus*. *BioControl* 49: 153-161.
- van Alphen J.J.M. & Vet L.E.M. 1986. An evolutionary approach to host finding and selection, pp. 23-61. Dans Waage J.K. & Greathead D.J. (Eds.), *Insect Parasitoid*. Academic Press. London.
- van Alphen J.J.M. & Visser M.E. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 59-79.
- van Valen L.V. 1973. A New Evolutionary Law. *Evol. Theory* 1: 1-30.
- Vanoosthuyse F. 2003. Stratégies de lâcher du prédateur *Hyaliodes vitripennis* Say (Hemiptera: Miridae): Impact du nombre de prédateurs et de leur distance d'introduction par rapport aux proies sur leur efficacité. Mémoire de Maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada.
- Vet L.E.M. & Dicke M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 141-172.
- Vet L.E.M., Wackers F.L. & Dicke M. 1991. How to hunt for hiding hosts: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Neth. J. Zool.* 41: 202-213.
- Vet L.E.M., Lewis W.J., Papaj D.R. & van Lenteren J.C. 1990. A variable response model for parasitoid foraging behavior. *J. Insect Behav.* 3: 471-491.
- Vinson S.B. 1972. Factors involved in successful attack on *Heliothis virescens* by the parasitoid *Cardiochiles nigriceps*. *J. Invert. Pathol.* 20: 118.
- Vinson S.B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 109-133.
- Vinson S.B. 1990. How parasitoids deal with the immune systems of their hosts: an overview. *Arch. Insect. Biochem.* 13: 3-27.
- Vinson S.B. & Iwantsch G.F. 1980. Host suitability for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 25: 397-419.
- Visser M.E. 1995. The effect of competition on oviposition decisions of *Leptopilina heteronoma* (Hymenoptera: Eucoilidae). *Anim. Behav.* 49: 1677-1687.
- Vitousek P.M. 1994. Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75: 1861-1876.
- Vitousek P.M., D'Antonio C.M., Loope L.L., Rejmánek M. & Westbrooks R. 1997. Introduced species : a significant component of human-caused global change. *New Zealand J. Ecol.* 21: 1-16.
- Völkl W. 1995. Behavioural and morphological adaptations of the coccinellid, *Platynaspis luteorubra* for exploiting ant-attended resources (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Insect Behav.* 8: 653-670.

- Völkl W. & Stadler B. 1996. Colony orientation and successful defence behaviour in the conifer aphid, *Schizolachnus pineti*. Entomol. Exp. Appl. 78: 197-200.
- Volkoff N. & Colazza S. 1992. Growth patterns of teratocytes in the immature stages of *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). Int. J. Insect Morph. Embryol. 21: 323-336.
- Waage J.K. & Godfray H.C.J. 1985. Reproductive strategies and population ecology of insect parasitoids, pp. 449-470. Dans Sibly R.M. & Smith R.H. (Eds.), Behavioural ecology: ecological consequences of adaptive behaviour. Blackwell, Oxford.
- Walker M.F. 1961. Some observations on the biology of the ladybird parasite *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hym., Braconidae), with special reference to host selection and recognition. Entomol. Month. Mag. 97: 240-244.
- Walker A.M. & Hoy M.A. 2003. Responses of *lipoplexis oregmae* (Hymenoptera: Aphidiidae) to different instars of *Toxoptera citricida* (homoptera: Aphididae). J. Econ. Entomol. 96: 1685-1692.
- Wang X.-G. & Keller M.A. 2002. A comparison of the host-searching efficiency of two larval parasitoids of *Plutella xylostella*. Ecol. Entomol. 27: 105-114.
- Watanabe M. 2002. Cold tolerance and myo-inositol accumulation in overwintering adults of a lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Eur. J. Entomol. 99: 5-9.
- Weseloh R.M. 1976. Reduced effectiveness of the gypsy moth parasite, *Apanteles melanoscelus*, in Connecticut due to poor seasonal synchronization with its host. Environ. Entomol. 5: 743-746.
- Wiedenmann R.N., Smith J.W., JR. & Rodriguez-del-Bosque L.A. 2003. Host suitability of the NewWorld stalkborer *Diatraea considerata* for three Old World *Cotesia* parasitoids. BioControl 48: 659-669.
- Williamson M. 1996. Biological invasions. Chapman & Hall Ltd, London, UK.
- Wolfe L.M., Elzinga J.A. & Biere A. 2004. Increased susceptibility to enemies following introduction in the invasive plant *Silene latifolia*. Ecol. Lett. 7: 813-820.
- Work T.T., McCullough D.G., Cavey J.F. & Komsa R. 2005. Arrival rate of nonindigenous insect species into the United States through foreign trade. Biol. Invasions. 7: 323-332.
- Wright E.J. & Laing J.E. 1978. The effects of temperature on development, adult longevity and fecundity of *Coleomegilla maculata lengi* and its parasite *Perilitus coccinellae*. Proc. Entomol. Soc. Ont. 109: 33-47.
- Wright E.J. & Laing J.E. 1982. Stage-specific mortality of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake on corn in southern Ontario. Environ. Entomol. 11: 32-37.
- Yarborough J.A., Armstrong J.L., Blumberg M.Z., Phillips A.E., McGahee E.M. & Dolen W.K. 1999. Allergic rhinoconjunctivitis caused by *Harmonia axyridis* (Asian lady beetle, Japanese lady beetle, or lady bug). J. Allergy Clinic. Immu. 104: 704-705.
- Yasuda H. & Ohnuma N. 1999. Effect of cannibalism and predation in the larval performance of two ladybird beetles. Entomol. Exp. Appl. 93: 63-67.
- Yasuda H. & Shinya K. 1997. Cannibalism and interspecific predation in two predatory ladybirds in relation to prey abundance in the field. Entomophaga 42: 153-163.
- Yasuda H., Evans E.W., Kajita Y., Urakawa K. & Takizawa T. 2004. Asymmetric larval interactions between introduced and indigenous ladybirds in North America. Oecologia 141: 722-731.

- Yasuda H., Kikuchi T., Kindlmann P. & Sato S. 2001. Relationship between attack and escape rates, cannibalism, and intraguild predation in larvae of two predatory ladybirds. *J. Insect Behav.* 14: 373-384.
- Zhang D., Dahlman D.L. & Järlfors U.E. 1997. Ultrastructure of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Braconidae: Hymenoptera) teratocytes. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 23: 173-187.
- Zhao B. & Wang M.X. 1992. Ultrastructure of the defense reaction against the larvae of *Macracanthorhynchus hirudinaeus* in laboratory-infected beetles. *J. Parasitol.* 78: 1098-1101.